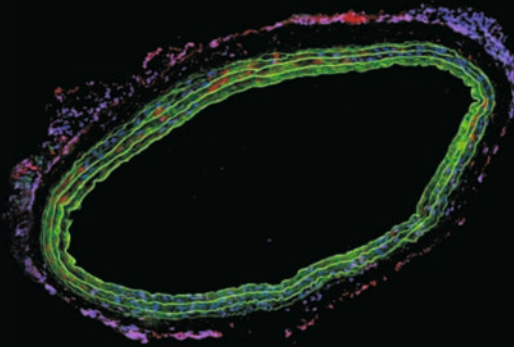


DIE ROLLE DER PHOSPHATASE PTEN WÄHREND DES VASKULÄREN REMODELINGS

ANDREAS MÜLLER



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Rolle der Phosphatase PTEN während des vaskulären Remodelings

Inauguraldissertation zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Andreas Müller
aus Münster/Westfalen

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Kardiologie / Angiologie des
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. Harald Tillmanns

Gutachter: Professor Dr. Daniel Sedding

Gutachter: Frau Professor Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Vorsitzender der Prüfungskommission: Professor Dr. Dr.T.Braun

Tag der Disputation: 01.08.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.2 Grundlagen der Atherosklerose und Restenose	3
1.2.1 Die Rolle glatter Gefäßmuskelzellen in der Atherosklerose und in Restenose-Prozessen	3
1.2.2 Die Rolle glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb von Remodeling-Prozessen	4
1.3 Aktuelle Therapiekonzepte vaskuloproliferativer Erkrankungen in der Kardiologie	5
1.4 Initiation und Regulation der Apoptose und Proliferation auf molekularer Ebene	7
1.4.1 Die Phosphatid-Inositol-3 Kinase-Signaltransduktion	7
1.5 Die Lipidphosphatase PTEN	9
1.5.1 PTEN agiert als Gegenspieler der PI3-Kinase	9
1.5.2 PTEN und Restenose	10
1.5.3 Historie und Aufbau des PTEN-Gens	10
1.5.4 Aufbau der Phosphatase PTEN	12
1.5.5 Biologische Rolle und Funktionen von PTEN	13
2 Fragestellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Geräte	18
3.2 Chemikalien	19
3.3 Antikörper	21
3.4 Inhibitoren Aktivationsassay	23
3.5 Small interfering RNAs (siRNAs)	23
3.6 <i>in situ</i> -Experimente	24
3.6.1 Biologische Materialien	24
3.6.2 Proteingewinnung	25
3.6.3 Immunhistochemie	25
3.6.4 Nachweis apoptotischer Zellen <i>in situ</i>	25
3.6.5 PTEN-Färbung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	26
3.7 <i>in vitro</i> -Experimente	27
3.7.1 Zellkultur	27
3.7.2 Isolierung von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte	27
3.7.3 Quantifizierung der Apoptoserate	27
3.7.4 Zellproliferation	28

3.7.5 Western Blot	29
3.7.6 Plasmide und Transfektion	35
3.7.7 Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)	36
3.7.8 RNA-Interferenz	36
3.7.9 Phosphatase-Assay	37
3.8 Statistik	37
4 Ergebnisse	38
4.1 Nach Gefäßverletzung ist die Expression von PTEN vermehrt	38
4.2 Die endogene Expression von PTEN während des Wachstums und der Apoptose	41
4.2.1 Die Expression von PTEN ist bei proliferierenden Zellen im Zeitverlauf unverändert	41
4.2.2 Die Expression von PTEN ist in apoptotischen Zellen vermehrt	41
4.3 Überexpression von PTEN verstärkt die Apoptose von VSMC	43
4.4 Knockdown von PTEN reduziert die Apoptoserate von VSMC	46
4.5 Si-RNA gegen PTEN führt <i>in vitro</i> zu einer Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen	48
4.6 Überexpression von PTEN verhindert die serum-vermittelte Akt-Phosphorylierung und wirkt somit pro-apoptotisch	49
5 Diskussion	52
5.1 Nach Gefäßverletzung ist die Expression von PTEN vermehrt	52
5.2 PTEN-Expression in den Phasen der Apoptose nach Gefäßverletzung	54
5.2.1 Die Expression von PTEN ist bei proliferierenden Zellen im Zeitverlauf unverändert	55
5.2.2 Die Expression von PTEN ist in apoptotischen Zellen vermehrt	56
5.3 Überexpression von PTEN	56
5.3.1 Überexpression von PTEN verstärkt Apoptose in VSMC	56
5.3.2 Überexpression von PTEN hemmt die Proliferation von VSMC	57
5.4 <i>Knockdown</i> von PTEN	58
5.4.1 Knockdown von PTEN mit siRNA verstärkt die Proliferation von VSMC	58
5.4.2 <i>Knockdown</i> von PTEN mit siRNA hemmt die Apoptose von VSMC	59
5.5 Überexpression von PTEN verhindert die serum-induzierte Akt-Phosphorylation	59

5.6 Co-Expression von PTEN und Akt kehrt den pro-apoptotischen Effekt einer PTEN-Überexpression um	60
6 Ausblick	62
7 Zusammenfassung	63
8 Abstract	65
Literaturverzeichnis	66
Publikationen	74
Abkürzungsverzeichnis	75
Erklärung gemäß Promotionsordnung	77
Danksagung	78

1. Einleitung

Trotz großer Fortschritte in der Erforschung der Ursachen und der Versorgung betroffener Patienten stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch heute noch eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt dar ^[1]. Ursächlich für die Mehrzahl dieser Erkrankungen sind Veränderungen auf kardiovaskulärer Ebene. So finden die entscheidenden pathophysiologischen Prozesse bei koronaren Herzerkrankungen (KHK) auf der Ebene der Gefäßwandungen statt. Auf der Grundlage ähnlicher Muster sind veränderte Fließeigenschaften und deren pathologische Konsequenzen unter anderem auf eine pathologische Zunahme des Anteils glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb der Gefäßwand zurückzuführen. Aktuelle präventive sowie auch therapeutische Strategiekonzepte fokussieren daher zunächst auf eine Reduktion der Risikofaktoren (u.a. Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Hypertriglyzeridämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie) oder eine Wiederherstellung des Blutflusses mittels Angioplastie oder chirurgischer Revaskularisation (Bypass-Operation).

Die derzeit wichtigste und erfolgreichste interventionelle Therapieoption stellt jedoch noch immer die Revision vaskulärer Stenosen vor Ort, insbesondere mittels percutaner-transcutaner Angiographie (PTCA), dar. Nach den anfänglich sehr positiven Ergebnissen der Ende der 1970er Jahre eingeführten Ballondilatation im Rahmen einer PTCA zeichneten sich jedoch bald Grenzen dieser Therapieoption ab. Nicht selten kam es im Anschluss an eine Dilatation zum akuten Gefäßverschluss. So zeigte sich in den ersten Monaten nach PTCA in 30 bis 50 % der Fälle eine Restenose der dilatierten Gefäße ^[2, 3].

Mit der Entwicklung von Gefäßstützen (Stents), die nach Dilatation in den gedehnten Gefäßbereich eingesetzt werden (heute bei circa 80 % der Interventionen), sollte diese hohe Rate von Wiederverschlüssen reduziert werden. Allerdings kommt es auch nach dem Einsatz dieser Stents in 30 % der Fälle zu Restenosen. Denn die zunächst verwendeten Stents verhinderten zwar das unmittelbare Wiederausziehen des Gefäßes nach Angioplastie (elastisches Recoil), doch war daraufhin eine verstärkte Proliferation der intimalen glatten Gefäßmuskelzellen zu beobachten, die den therapeutischen Benefit stark einschränkte ^[4]. Folge ist das bis heute bestehende Problem der sogenannten In-Stent-Restenose.

Seit einigen Jahren hat sich die Beschichtung von Stents mit zellzyklushemmenden, anti-proliferativen Substanzen durchgesetzt. Die größten Erfahrungen liegen zurzeit für die Wirkstoffe Paclitaxel und Rapamycin (Sirolimus) vor.

In der RAVEL-Studie konnte gezeigt werden, dass nach Einlage von mit Rapamycin beschichteten Stents die Restenoserate 6 Monate nach PTCA bei 0 % lag, während sie in der Kontrollgruppe bei Patienten mit unbeschichteten Stents 26 % betrug ^[5].

Im 3-Jahres-Follow-up dieser Studie zeigte sich ein ereignisfreies Überleben bezüglich einer erneuten Revaskularisation der Zielläsion (TLR) von 93,7 % in der Sirolimus-Gruppe gegenüber 75 % in der Kontrollgruppe und für „target vessel failure“ (TVF), definiert als „Versagen“ des Zielgefäßes in Form von Herztod, Myokardinfarkt oder erneute Revaskularisation am Zielgefäß (TVR), von 87,9 % gegenüber 67,3 % in der Kontrollgruppe. Die Rate für „Major adverse cardiac events“ (MACE), die als Tod, Q-wave oder Non-Q-wave-Myokardinfarkt, Bypass oder TLR definiert wurden, lag bei 15,8 % in der Sirolimusgruppe und bei 33,1 % in der Kontrollgruppe ^[6]. Dennoch benötigen 20 % der Patienten mit Restenose letztendlich eine Bypassoperation zur notwendigen Revaskularisierung. Doch auch danach kommt es jährlich bei 10 bis 30 % der Patienten zu einem Transplantatversagen, ausgelöst durch eine Stenosierung der venösen Bypässe ^[7]. Durch die im September 2006 auf dem Europäischen Kardiologenkongress in Barcelona veröffentlichten Ergebnisse der BASKET-LATE-Studie wurde die Anwendung von Drug-eluting-Stents (DES) zunächst sehr kritisch betrachtet, da in dieser randomisierten Studie gezeigt werden konnte, dass nach routinemäßigem Absetzen von Clopidogrel 6 Monate nach der Stentimplantation späte Stentthrombosen bei DES zwei- bis dreimal häufiger auftraten als bei unbeschichteten Stents ^[8].

Auf dem amerikanischen Kardiologenkongress im Frühjahr 2009 in Orlando konnte jedoch dank einer erneuten Auswertung von mittlerweile 262.700 Patientendaten gezeigt werden, dass medikamenten-freisetzende Stents reinen Metall-Stents bei der Vorbeugung von Tod und Herzinfarkten überlegen sind. Das belegen Daten von Patienten aus einem US-Register.

So traten 30 Monate nach Implantation von Drug-eluting-Stents deutlich weniger Todesfälle (12,9 % vs. 17,9 %) und Herzinfarkte (7,3 von 100 Patienten vs. 10,0 von 100 Patienten) auf im Vergleich zu den Metallstent-Trägern, ohne Unterschied im Auftreten von Schlaganfällen oder Blutungen. Eine duale kombinierte antithrombozytäre Therapie mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel über einen Zeitraum bis zu einem Jahr zur Vermeidung der In-Stent-Restenose oder späteren In-Stentthrombose bewies sich als wirksam und ist nach heutiger Erkenntnis unverzichtbar ^[9].

1.2 Grundlagen der Atherosklerose und Restenose

1.2.1 Die Rolle glatter Gefäßmuskelzellen in der Atherosklerose und in Restenose-Prozessen

Die Atherosklerose ist eine chronische, multifaktorielle Erkrankung, deren Entstehung in einem ständig andauernden Reiz auf die Gefäßwand verstanden wird. Wichtige Risikofaktoren sind u.a. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Tabakkonsum.

Durch andauernde Reizung der Gefäßwand kommt es zur Dysfunktion und Schädigung des Endothels. In der Folge kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion des Gefäßes. Diese führt zu einer subendothelialen Einwanderung von Leukozyten, einer intrazellulären Akkumulation von Lipiden und schließlich der Aktivierung und Zunahme der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie der Aktivierung von Thrombozyten mit Thrombusbildung. Die eingewanderten Leukozyten sammeln sich schließlich in entstehenden atherosklerotischen Läsionen und sezernieren zusammen mit den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine. Diese vermitteln dann die Chemotaxis, die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Synthese extrazellulärer Matrixproteine^[10]. Diese Vorgänge sind im Wesentlichen für chronische Umbauprozesse innerhalb der Gefäßwand verantwortlich zu machen, in deren Folge die Akkumulation von atherosklerotischem Gewebe sowie einer Hyperplasie der Intima zu den pathophysiologisch entscheidenden Blutflussveränderungen in den betroffenen Gefäßstrecken beiträgt.

In vielen Studien konnte der entzündlichen Komponente während aller Phasen der Atherosklerose von der Entstehung der Plaque bis hin zu thrombotischen Komplikationen eine zentrale pathogenetische Rolle zugewiesen werden^[11, 12]. Zusätzlich zur entzündlichen Komponente der Erkrankung kommt es jedoch mit der zunehmenden Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen - sowohl in der Entstehung der Atherosklerose als auch bei restenotischen Prozessen - zu einer für den Verlauf und die Folgen dieser Erkrankungen wesentlichen Veränderung^[10, 13, 14]. So scheint die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen in der Intima für viele Autoren ein Vorläufer der sich entwickelnden Läsionen zu sein. Die Grundlage dieser Gefäßveränderungen wird hierbei oft bereits im Kindesalter gelegt, die sich im Laufe des Alterns zu einer Verdickung der Gefäßwandungen ausbildet^[14, 15].

Auf der Suche nach weiteren Komponenten der Pathogenese derartiger Gefäßwandveränderungen konnte auch der Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media oder sogar Adventitia in die entstehende Neointima eine Beteiligung nachgewiesen werden^[16]. In der

fortgeschrittenen Läsion formen schließlich glatte Gefäßmuskelzellen zusammen mit Fibroblasten und extrazellulärer Kalzifikation eine stabile, fixierte fibrokalzifizierte Läsion.

Den glatten Gefäßmuskelzellen kommt somit eine bedeutende Schlüsselposition bei der Entstehung der Atherosklerose und restenotischen Prozessen zu, da ihr Schicksal maßgeblich die hämodynamischen Fließeigenschaften des Blutes, über ihre Fähigkeit zu proliferieren, migrieren und Apoptose einzuleiten, beeinflusst.

1.2.2 Die Rolle glatter Gefäßmuskelzellen innerhalb von Remodeling-Prozessen

Faktoren, die zu einer Restenose nach Angioplastie führen, sind im Wesentlichen elastisches Recoil (unmittelbares Zusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie), Intimahyperplasie und vaskuläres Remodeling ^[17, 18].

Eine PTCA mit Ballondilatation führt lokal begrenzt zu einem akuten Gefäßtrauma, in deren Folge es zu einer Verletzung der Gefäßwand mit Abscherung des Endothels kommt. An der nun freiliegenden Gefäßwand lagern sich Thrombozyten an. Durch diese Thrombozytenaggregation kommt es auch im Rahmen der vaskulären Irritation zur Adhäsion, Akkumulation und Aktivierung inflammatorischer Zellen. Folge ist eine Entzündungsreaktion ^[19] in der Gefäßwand. Dies führt zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukine, TNF, MCP-1) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, bFGF), die den Zellzykluseintritt glatter Gefäßmuskelzellen aktivieren. Dadurch kommt es neben einer Migration verschiedener Zellen insbesondere zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie zu chronischen Umbauprozessen in der Gefäßwand (negatives Remodeling), die zu einer Hyperplasie der Intima führen.

Während das unmittelbare elastische Recoil des Gefäßes zunächst durch den Einsatz von Stents verhindert werden kann, wirkt der durch den Einsatz des Stents verursachte mechanische Reiz stark irritierend auf die Gefäßwand. So führt bereits die (mechanische) Manipulation im Rahmen der Ballondilatation lokal über eine endotheliale Schädigung zu einer Verstärkung der Proliferation der intimalen glatten Gefäßmuskelzellen ^[4, 20]. Diese zunächst mechanisch ausgelösten Umbauvorgänge werden in der Folge von einer Entzündungsreaktion in der Gefäßwand verstärkt, die zur weiteren Ausprägung der Gefäßwandveränderung und den daraus resultierenden veränderten Flusssituationen innerhalb der betroffenen Gefäßstrecke beiträgt (s.o.). Das Zusammenspiel dieser pathologischen Prozesse ist eine als Remodeling bezeichnete Reaktion des Gefäßes. Denn bis zu einem gewissen Grad besitzen Gefäße grundsätzlich die Fähigkeit, ihre Struktur den geänderten Fluss-/Druckverhältnissen

anzupassen. So kann der Durchmesser des Gefäßlumens bei gleichzeitiger Vergrößerung der Gefäßwand trotz der Akkumulation von atherosklerotischem oder neointimalem Gewebe zunächst unverändert bleiben^[21]. Im Verlauf der Atherosklerose hängt der Durchmesser des Gefäßlumens dagegen von der Balance zwischen Faktoren ab, die eine Vergrößerung des Lumens (positives Remodeling) bewirken, und solchen Faktoren, die, getriggert durch die entzündliche Gefäßantwort, eine zunehmende Neointima-Bildung und Stenosierung des Gefäßes (negatives Remodeling) bewirken^[22]. Hauptverantwortlich für diese neointimale Stenosierung der Gefäße ist auch in dieser Situation eine Aktivierung und der Wiedereintritt der glatten Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus, aus der nachfolgend eine ansteigende Proliferation resultiert.

Die Bedeutung des apoptotischen Zelltodes von VSMC wurde von mehreren Arbeitsgruppen als charakteristisches Merkmal des Gefäßremodelings nach einem akutem Gefäßtrauma herausgestellt und wird zunehmend als Prognosemarker für das Ausmaß der späteren Proliferation angesehen^[23-29, 30].

Aus dieser Erkenntnis könnten sich mögliche Therapieansätze entwickeln im Bestreben, die Proliferation der Zellen zu unterdrücken.

1.3 Aktuelle Therapiekonzepte vaskuloproliferativer Erkrankungen in der Kardiologie

Es wurde in zahlreichen Ansätzen versucht, die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen direkt zu hemmen. Der Einsatz antiproliferativ wirksamer Medikamente wie Heparine, ACE-Hemmer, Antagonisten gegen Wachstumsfaktoren wie Terbinafin oder Trapidil, Angiopeptin, zytostatische Agenzien wie Etoposide oder auch Doxorubicin konnten aber nicht zu dem erhofften Erfolg führen^[31].

Deutlich wurde aber auch, dass multifaktoriell bedingte vaskuläre Pathologien, wie die Atherosklerose oder Restenose, nicht durch die Hemmung eines einzelnen Faktors zu beeinflussen sind. Sehr viel erfolgversprechender erscheint daher der Ansatz an einer entscheidenden Ursache der gefäßverändernden Prozesse, wie der Apoptose und Proliferation von VSMC, auf molekularer Ebene. So liegt das Augenmerk seit einigen Jahren auf der Beeinflussung des Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke multipler proliferativer Stimuli.

Die Hemmung des Zellzyklus wurde bereits durch unterschiedliche pharmakologische Substanzen, gentherapeutische Ansätze oder Strahlentherapie erreicht. Neben einer großen Anzahl wirksamer Substanzen wie Paclitaxel (Taxol) und Flavopiridol^[32] stellt das Makrolid-

Antibiotikum Rapamycin durch seine spezifisch anti-proliferative Wirkkomponente eine der derzeit attraktivsten Substanzen dar: In der ‚RAVEL‘-Studie konnte durch Inhibierung der VSMC-Proliferation mit Sirolimus-beschichteten Stents ein Jahr nach Implantation eine Restenoserate von 0 % im Gegensatz zu 26 % in der Patientengruppe mit unbeschichteten Stents erzielt werden ^[5].

Weiterhin kann eine Inhibition der Proliferation über Paclitaxel (Taxol) durch eine Hemmung der Ausbildung von Mikrotubuli erreicht werden ^[33], während durch Flavopiridol die ATP-bindende Seite der Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent-kinases, CDK) blockiert oder mittels CVT-313, eine Inhibierung der Zyklin-abhängige Kinase 2, CDK-2, induziert werden ^[34]. Ein möglicher Einsatz dieser Substanzen liegt, wie oben bereits für Rapamycin und Paclitaxel beschrieben, in der lokalen Anwendung, z.B. in der Beschichtung von Stents.

Andere Ansätze zur Reduktion der Restenoserate verfolgten vorübergehend strahlentherapeutische Methoden ^[35-37]. Diese Strahlentherapie erfolgt entweder mit Hilfe radioaktiver Drähte, so genannten „seeds“ oder durch radioaktive Lösungen, mit denen die dilatierten Gefäße über einen Zeitraum von wenigen Minuten bestrahlt werden ^[38]. Auswertungen von unternommenen Metaanalysen konnten für diese Therapiekonzepte jedoch keinen langfristigen Erfolg nachweisen.

Auch die direkte Implantation von radioaktiven Stents ist möglich. Allerdings kommt es dabei zum gesteigerten Auftreten von Nebenwirkungen, wie der späten In-Stent-Thrombose oder der Ausbildung von Stenosen an den Endbereichen der Stents („*candy-wrapper*“-Stenosen) ^[39]. Getherapeutische Ansätze reichen von „antisense“-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) über Transkriptionsfaktor-„decoy“-Konstrukte bis hin zur Überexpression proliferationshemmender Gene ^[31]. So konnte gezeigt werden, dass „decoy-ODN“ gegen das Zellzyklusprotein E2F die Neointimabildung in peripheren und koronaren Bypässen signifikant verringern kann ^[7, 40]. Die dargestellten unterschiedlichen Wirkstoffe zur Hemmung der Proliferation in der klinischen Versorgung von kardiovaskulären Patienten trägt der zentralen Bedeutung der gesteigerten Zellteilung in der Pathophysiologie vaskulärer Phänomene wie der Atherosklerose und der Restenose Rechnung.

1.4 Initiation und Regulation der Apoptose und Proliferation auf molekularer Ebene

1.4.1 Die Phosphatid-Inositol-3 Kinase-Signaltransduktion

Eine zentrale Rolle der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) in der Signalverschaltung des zellulären Proliferationsgeschehens ist bereits durch die Untersuchungen vieler Arbeitsgruppen ausführlich beschrieben worden. Insbesondere der Proteinkinase B (Akt) kommt dabei eine prominente Stellung zu: Nach Aktivierung einer membranständigen Rezeptortyrosinkinase durch z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren (PDGF, IGF, etc.) wird die PI3-K aktiviert, die ihrerseits Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zum aktiven Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Durch Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) werden weitere Zellzyklus-regulierende *downstream*-Ziele wie die p70^{S6}-Kinase oder die Forkhead-Transkriptionsfaktoren (u.a. FoxO 1a-3a) beeinflusst^[41]. Die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) wiederum unterliegt der entscheidenden und in diesem Falle dephosphorylierenden Kontrolle von Inositol-Phosphatasen. In einem Falle sind sie durch eine Src-Homologie-2-Domäne (Src = virale Tyrosinkinase aus Sarcoma Virus), die eine Polyphosphat-Phosphatase beinhaltet, (vereinfacht als SHIP bezeichnet) gekennzeichnet oder besitzen eine Phosphatase-und-Tensin-Homologie, mit Deletion auf Chromosom 10 (dann als PTEN bezeichnet). In dieser Position der Verschaltungskaskade wirken sie dementsprechend antagonistisch zum PI3-K/Akt-Signaltransduktionsweg und sind dadurch mit der grundsätzlichen Proliferationskapazität von Zellen eng zu assoziieren^[42-45]. Ein Mangel dieser Inositol-Phosphatasen resultiert demnach in einer Akkumulation von PIP₃ und der dementsprechenden Aktivierung ihrer *downstream*-Zielmoleküle, der PI3-K und schließlich Proteinkinase B (Akt).

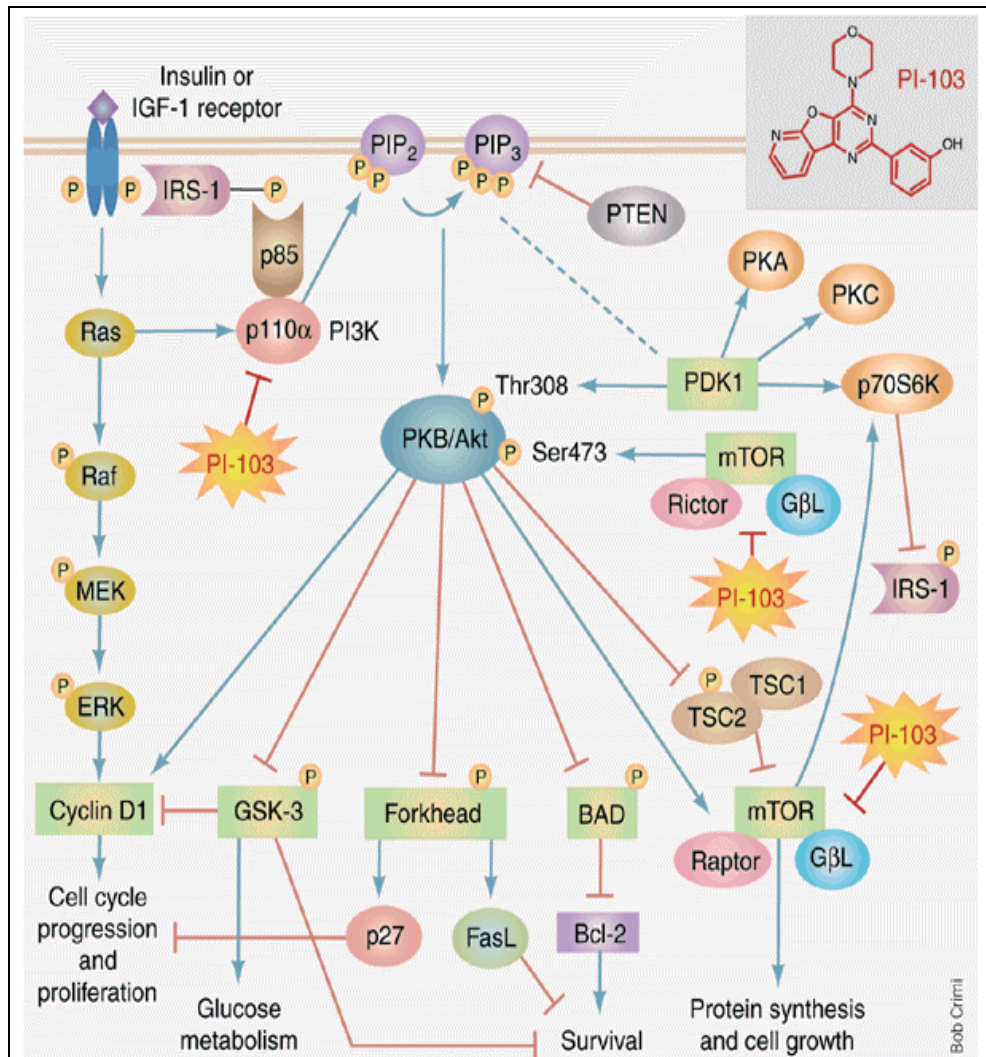


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Proliferationsinitiierung über den PI3-K/Akt Signaltransduktionsweg

Isoformen der Klasse I PI3-Kinase (z.B. p 110α) werden durch liganden-gebundene Rezeptortyrosinkinasen (PDGF, Insulin, IGF, etc.) aktiviert, die ihrerseits Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zum aktiven Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP₃) phosphorylieren und damit die Proteinkinase B/Akt zur Zellmembran rekrutieren. Über eine duale Phosphorylierung durch PDK-1 und den mTOR-rictor Komplex (mTORC2) wird die Proteinkinase B/Akt aktiviert.

Aktivierte Proteinkinase B/Akt phosphoryliert zahlreiche Substrate, die für die zelluläre Regulation notwendig sind.

Die Phosphatase PTEN tritt als Gegenspieler der PI3-Kinase auf, indem sie PIP₃ dephosphoryliert und eine Aktivierung der Proteinkinase B/Akt verhindert.

Paul Workman, Paul A Clarke, Sandrine Guillard & Florence I Raynaud

Aus *Nature Biotechnology* **24**, 794 - 796 (2006)⁴⁶

doi:10.1038/nbt0706-794, Drugging the PI3 kinome

Aktiviertes Akt phosphoryliert beispielsweise ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, das *Bcl-2-Antagonist of Cell Death-Protein* (BAD) und wirkt dadurch anti-apoptotisch. Auch in Zellen, die BAD nicht exprimieren, kann Akt das Überleben sichern, indem der Forkhead-Transkriptionsfaktor FoxO3a im Nucleus durch Akt phosphoryliert wird und somit die Aktivierung zellzyklushemmender Proteine verhindert. In Konsequenz führt FoxO3a im dephosphorylierten Zustand wahrscheinlich über Induktion der Expression apoptoseauslösender Gene zur Apoptose^[20].

1.5 Die Lipidphosphatase PTEN

1.5.1 PTEN agiert als Gegenspieler der PI3-Kinase

Das Schicksal der einzelnen Gefäßmuskelzelle wird maßgeblich durch den regulierenden Einfluss der PI3-Kinase moduliert und ist somit in das sensible Gleichgewicht zwischen Aktivierung des Zellzyklus (Zellproliferation) und des Zellzyklusarrests involviert.

Eine besondere Funktion innerhalb der frühen PI3-K-Signaltransduktion zur Initiierung von Proliferation kommt dabei der dual-spezifischen Lipid- und Proteinphosphatase PTEN zu, die als Gegenspieler der PI3-Kinase PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert und somit eine Aktivierung weiterer nachgeschalteter Signalwege, wie z.B. der Proteinkinase B (Akt) und schließlich der Proliferation der Zelle durch Wiedereintritt in den Zellzyklus verhindert^[47, 48].

Wie kürzlich gezeigt, konnte eine PDGF-induzierte zelluläre Proliferation, Migration und das Überleben von VSMC sowie die Formation der neointimalen Hyperplasie in Carotiden von Ratten erfolgreich durch Beeinflussung der PTEN-Regulation gehemmt werden^[49, 50].

Anfänglich als Tumorsuppressorprotein beschrieben, ist die bedeutende Funktion von PTEN mittlerweile von der Regulation des Immunsystems über die kürzlich entdeckte Beeinflussung im neuronalen Wachstum bekannt^[51]. Über weitere Signalmoleküle des PI3K-Signalweges beeinflusst PTEN die Proliferation und Apoptose der Zelle: Die 70 kDa ribosomale S6 Kinase (p70S6K) wird als Reaktion auf Mitogene und Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-1) im Zuge des PI3K-Signaltransduktionsweges durch Phosphorylierung aktiviert. Über Phosphorylierung der Ribosomen-Untereinheit S6 und folglich gesteigerter ribosomaler Biosynthese wird das Zellwachstum durch p70S6K positiv reguliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die p70S6K-vermittelte Phosphorylierung von BAD, einem pro-apoptotischen Mitglied der BCL-2-Familie, Überlebenssignale übertragen werden können^[52]. Zellen mit PTEN-Mangel zeigen erhöhte Spiegel an PIP_3 , phosphoryliertem Akt und p70S6K. Diese Veränderungen

führen zu gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose von T- und B-Zellen, unreifen Neuronen, Keratinozyten und Milchdrüsenepithel ^[53].

1.5.2 PTEN und Restenose

Wie bereits dargestellt, ist die Entwicklung einer vaskulären Restenose hauptsächlich durch die Reaktivierung der normalerweise ruhenden glatten Gefäßmuskelzellen verursacht, die daraufhin proliferieren und migrieren. Als Antwort auf die Verletzung der Gefäßwand folgt eine Hyperplasie der Neointima mit konsekutiver Lumeneinengung, die im Wesentlichen für die Pathophysiologie der Erkrankung verantwortlich zu machen ist.

Hinweise auf eine speziell regulierende Eigenschaft von PTEN an einer Schlüsselposition des zellulären Teilungsprogramms fanden sich weiterhin durch Berichte, nach denen eine Überexpression von PTEN die Proliferation und Migration der verantwortlichen glatten Gefäßmuskelzellen hemmen und zugleich eine Apoptoseinduktion herbeiführen konnte ^[54]. PTEN interagiert mit dem target of Rapamycin (TOR), welches eines der aussichtsreichsten Zielmoleküle zur therapeutischen Intervention der Restenose darstellt ^[55].

Tatsächlich konnten die Ergebnisse der RAVEL-Studie zeigen, daß eine Inhibition von TOR durch Rapamycin-freisetzende Stents die Restenoserate beträchtlich reduzieren kann ^[55]. Da die Proteinkinase B (Akt) die Kinase TOR phosphoryliert und dadurch aktiviert ^[56, 57], könnte eine durch PTEN-verhinderte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) somit TOR inhibieren. Neue Erkenntnisse belegen die herausragende Bedeutung von PTEN bei der Regulation der Apoptose sowie der Zellproliferation und der Zellmigration durch Inhibition der Akt-Aktivierung ^[58].

Daher stellte sich uns die Frage, ob PTEN in seiner Eigenschaft als Gegenspieler der PI3-Kinase neben der antiproliferativen Wirkung nicht sogar einen pro-apoptotischen Effekt auf VSMC haben könnte. Diese Wirkweisen können für das Verständnis des Entstehens der Atherosklerose sowie der Restenose nach Ballondilatation neue Erkenntnisse liefern und möglicherweise darüber hinaus auch therapeutische Perspektiven eröffnen.

1.5.3 Historie und Aufbau des PTEN-Gens

Das Tumorsuppressorgen PTEN wurde 1997 zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen entdeckt. Die Veröffentlichung von Li et al. erschien als erste im März 1997 in *Science* ^[59]. Hier wurde der bisher geläufigste Name „PTEN“ (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN) geprägt. Im April 1997 beschrieben Steck et al. das gleiche Gen unter dem

Namen MMAC1 (Mutated in Multiple Advanced Cancers)^[60]. Schließlich ist PTEN auch unter dem Namen TEP1 (TGF-regulated and Epithelial cell enriched Phosphatase) bekannt^[61].

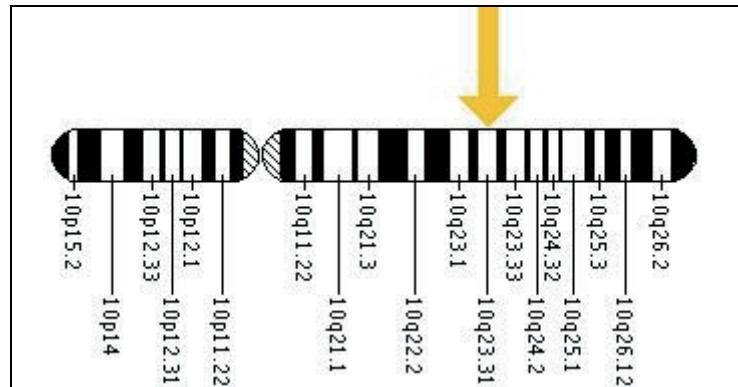


Abbildung 2: PTEN-Gen

Das PTEN-Gen ist auf dem langen (q) Arm des Chromosom 10, auf Position 23.3 lokalisiert worden. (Im Detail befindet sich der Genlokus auf Chromosom 10 zwischen den Basenpaaren 89.613.174 und 9.716.381)

Die Entdeckung von PTEN lässt sich auf ein gehäuftes Auftreten von LOH (loss of heterozygosity) im Bereich 10q22 – 26 des Chromosoms 10 bei einer Vielzahl von Tumoren zurückführen^[60]. Betroffen sind neben Prostatatumoren^[62] unter anderem Melanome, Glioblastome sowie Nieren-, Brust- und Lungenkrebs^[59, 63, 64]. Das Tumorsuppressorgen PTEN wurde daraufhin durch Representational-Difference-Analyse^[59] (RDA) und Hybridisierungen mit Markern aus der Region sowie Northern Blot^[60] auf die Region 10q23.3 eingegrenzt. Keimzellmutationen von PTEN führen zur Cowden-Krankheit und zum Bannayan-Zonana-Syndrom^[65]. Die betroffenen Patienten leiden unter der Bildung unterschiedlicher gutartiger Tumoren (Hamartome) und darüberhinaus einem erhöhten Risiko an bösartigen Tumoren zu erkranken^[66].

In frühen Stadien von Tumoren ist das PTEN-Gen in der Regel intakt, was bedeutet, dass PTEN nicht mit der Initiation von Tumoren in Verbindung gebracht werden kann. In späten Tumorstadien und Metastasen hingegen findet man vermehrt Deletionen und damit die Inaktivierung des PTEN-Gens. Daraus kann man schließen, dass der Verlust von PTEN für Wachstum und Metastasierung von Tumoren und nicht zuletzt für die Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt. Das PTEN-Gen besteht aus 9 Exons und ist insgesamt 46.825 bp groß.

Die Transkription führt zu unterschiedlich langen mRNA-Species, was auf das Vorhandensein von mehreren Polyadenylierungssignalen hindeutet ^[67].

1.5.4 Aufbau der Phosphatase PTEN

Eine Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei dem vom PTEN-Gen abgeleiteten Protein um eine Phosphatase handelt, die von Exon 5 codiert wird. Die Phosphatase besteht aus 403 Aminosäuren und einer relativen Molekülmasse von ca. 47 kDa. Die PTEN-Sequenz legt nahe, dass es sich um eine dual-spezifische Phosphatase handelt.

Die N-terminale Phosphatase-Domäne von PTEN (ca. 180 Aminosäuren) zeigt Ähnlichkeit mit anderen Protein-Phosphatasen, besitzt jedoch eine vergrößerte aktive Region für die Wechselwirkung mit PI3,4,5-P₃ (PIP₃). Zusätzlich zur genannten Protein-Phosphatase-Aktivität zeigt PTEN eine hochspezifische Funktion als Lipid-Phosphatase: PIP₃ wird an Position 3 des Inositolringes dephosphoryliert.

Viele Untersuchungen weisen darauf hin, dass insbesondere die Lipid-Phosphatase-Aktivität von grundlegender Bedeutung für die Funktion als Tumorsuppressor und die normale Entwicklung ist ^[53, 68-71]. Es wird davon ausgegangen, dass die C2-Domäne (ca. 165 Aminosäuren) PTEN an die Plasmamembran bindet und die Ausrichtung der katalytischen Domäne für die Interaktion mit PIP₃ und anderen potentiellen Substraten bewirkt ^[69, 71].

Der C-terminalen „Schwanz“-Region (ca. 50 Aminosäuren) werden regulatorische Eigenschaften zugeordnet. So konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung bestimmter Serin- und Threonin-Reste die enzymatische Aktivität und Stabilität von PTEN modulieren kann. Eine Dephosphorylierung oder Deletion der „Schwanz“-Region resultiert in einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität und rapider Degradation. Als Schlüsselenzym, welches die Regulation der Phosphorylierung der C-terminalen Serin- und Threonin-Reste übernimmt, wird die Protein-Kinase CK2 (auch als Casein-Kinase II bezeichnet) betrachtet ^[69, 72].

PTEN besitzt an seinem C-Terminus eine potentielle Bindungsstelle für Proteine mit PDZ (*PSD-95/Dlg/ZO-1*)-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine mit PDZ-Domäne den Zusammenbau von Multiprotein-Komplexen dirigieren, was z.B. die Lokalisation von Ionenkanälen und Adhäsionsmolekülen an Zell-Zell-Kontaktstellen inklusive Synapsen beinhalten könnte ^[68, 73]. Der PDZ-Bindungsdomäne könnte also eine Rolle bei der Veränderung der Balance von PTEN-Effekten auf stromabwärts gelegene Effektoren wie Akt und anderen Systemen wie z.B. der RAC-vermittelten Signalübertragung zukommen ^[72, 74, 75].

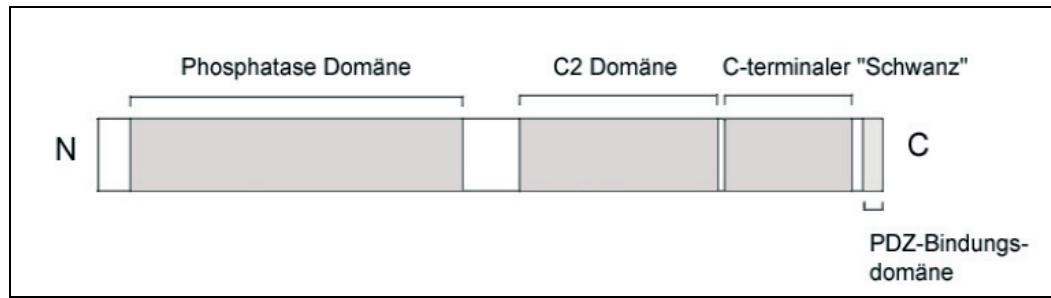


Abbildung 3: Domänenstruktur von PTEN

Die N-terminale Phosphatase-Domäne ist sowohl für Membranbindung als auch für die katalytische Aktivität erforderlich. Die C2-Domäne stellt eine zweite essentielle Membranbindungsdomäne dar. Zumindest in Säugetieren besitzt die C-terminale „Schwanz“-Region eine Funktion bei der Regulation der Aktivität und Stabilität des Moleküls. Die PDZ-Domäne beeinflusst vermutlich die subzelluläre Lokalisation des Moleküls (nach GOBERDHAN und Wilson ⁴³).

1.5.5 Biologische Rolle und Funktionen von PTEN

Die meisten Säugetierzellen, die das Wildtyp *PTEN*-Gen enthalten, exprimieren unter normalen Wachstumsbedingungen messbare Spiegel an PTEN-mRNA und Protein ^[76]. Grundsätzlich ist ein Einfluss von PTEN auf zellulärer Ebene auf folgende Bereiche differenziert worden ^[68, 72].

I. Embryonalentwicklung

Für die physiologische Entwicklung des Organismus wird PTEN eine essentielle Rolle zugeschrieben: Verschiedene PTEN-Mutanten zeigten im Maus-Modell bei Homozygotie eine frühe embryonale Sterblichkeit. Es wird angenommen, dass das PTEN-Gen wichtige Funktionen bei Differenzierung und Organisation der Keimblätter übernimmt. Auf diese Weise scheint es an der Regulation lokaler Apoptose und/oder Proliferation beteiligt zu sein. Dabei können die Funktionen je nach Gewebe, Wachstumsbedingungen und genetischem Hintergrund variieren ^[68, 72, 77].

II. Tumorsuppressor/Proliferation

Mäuse mit heterozygoter PTEN-Mutation demonstrierten eine gesteigerte Tumorzinzidenz in Einklang mit der Identifikation von PTEN als Tumorsuppressorgen ^[68]. Übereinstimmend mit der Vorstellung, dass ein Tumorsuppressor in der Lage ist, Zellproliferation zu unterdrücken, konnte in einigen Ansätzen durch Wiederherstellung der PTEN-Expression ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus ausgelöst werden, einhergehend mit Anstieg der Spiegel von Zellzyklusinhibitoren wie p27KIP1 und Absinken der Rb Protein Phosphorylierung ^[72, 78]. Der Arrest in der G1-Phase wird zurückgeführt auf die Lipid-Phosphatase-Aktivität von PTEN gegenüber PIP₃ ^[79].

III. Apoptose

Zellen mit mutiertem PTEN erweisen sich infolge konstitutiver Proteinkinase B/Akt-Aktivität als z.T. resistent gegen Apoptose-stimulierende Einflüsse wie UV-Bestrahlung, Hitzebehandlung und TNF- α (*tumor necrosis factor- α*). Expression von exogenem PTEN in mutierten Zellen stellt die Empfindlichkeit gegen Apoptose-Stimuli und das normale Ausmaß der Proteinkinase B/Akt-Phosphorylierung wieder her. Diese Eigenschaft des Überlebens ist bei vielen transformierten und malignen Zellen fehlerhaft.

Es wurde eine funktionelle Verknüpfung von Apoptose mit dem Signalübertragungs- und Gerüstprotein *focal adhesion kinase* (FAK) nachgewiesen. Die Interaktion von Integrinen mit Proteinen der extrazellulären Matrix kann FAK aktivieren und Apoptose in normalen Epithel- und Endothelzellen unterdrücken ^[72, 80].

FAK ist eine für fokale Adhäsionsstellen charakteristische Tyrosinkinase, über die die Organisation des Zytoskelettes und Signalübertragungswege zusammengeführt werden. Fokale Adhäsionsstellen sind Strukturen der Zellmembran, an denen Integrine über ihre extrazellulären Domänen Kontakt zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix aufnehmen. Diese Integrine binden über intrazelluläre Domänen Proteine, die einerseits den Kontakt zu Aktinfilamenten herstellen, andererseits die Interaktion der verschiedenen Komponenten regeln. Eine Möglichkeit der Aktivierung von PI3-K besteht in der direkten Bindung an FAK. In malignen Zellen wurden erhöhte Spiegel an FAK festgestellt, was es diesen Zellen möglicherweise gestattet, Apoptose zu umgehen ^[72, 81]. Die PTEN-Interaktion mit FAK ist eine notwendige Voraussetzung für die PTEN-vermittelte Dephosphorylierung. In Zellen mit PTEN-Mutation bleibt die Tyrosin-Phosphorylierung in FAK auch nach Trennung von Matrix-Substraten erhalten, was einhergeht mit Aufrechterhaltung von FAK/PI3-K-Assoziation, PI3-K-Aktivität, PIP₃-Spiegeln, Akt-Phosphorylierung sowie Resistenz gegen durch den Verlust des Matrix-Kontaktes induzierte Apoptose. Die Rolle von FAK bei der Apoptose besteht zumindest zum Teil in der Fähigkeit, den PIP₃-Spiegel durch Förderung der PI3-K-Aktivität zu erhöhen. Die Protein-Tyrosinphosphatase-Aktivität von PTEN inhibiert möglicherweise über Dephosphorylierung von FAK dessen Wirkung auf PI3-K.

PTEN moduliert Apoptose durch die Reduzierung der Konzentration von PIP₃. Dieses Signalpeptid vermittelt die Aktivierung von Akt, das als ein zentrales Regulationsprotein der Apoptose angesehen werden kann, über die Kinasen PDK1 und PDK2 (*phosphoinositide-dependent kinase1/2*).

Es werden also kombinierte Effekte von PTEN im Rahmen der Förderung von Apoptose deutlich: Herabregulation des PI3-K/Akt-, „Überlebens“-Signalweges nicht nur durch direkte Dephosphorylierung von PIP₃, sondern auch durch Inhibierung der im Signalweg stromaufwärts gelegenen FAK ^[82].

IV. Angiogenese

Die Arbeitsgruppe von Huang und Kontos fand heraus, dass die Inhibierung von endogenem PTEN in kultivierten Endothelzellen mittels Adenovirus-mediierter Überexpression einer dominant-negativen PTEN-Mutante *vascularendothelial growth factor* (VEGF)-vermittelte Akt-Phosphorylierung förderte. Dieser Effekt korrelierte mit einer Abnahme der Caspase-3-Spaltung, Caspase-Aktivität und DNA-Degradation nach Induktion von Apoptose durch TNF- α ^[83]. Die Überexpression der dominant-negativen PTEN-Mutante steigerte darüber hinaus VEGF-medierte Proliferation und Migration von Endothelzellen. Im Kontrast hierzu inhibierte Überexpression von Wildtyp-PTEN die anti-apoptotischen, proliferativen und chemotaktischen Effekte von VEGF.

Die Inhibition der Akt-Aktivierung durch PTEN führt somit zu einer weitreichenden Modulation der multiplen nachgeschalteten Signalwege ^[84, 85], so dass letztendlich ein Wiedereintritt in den Zellzyklus und damit eine Proliferation der Zelle unterbunden ist.

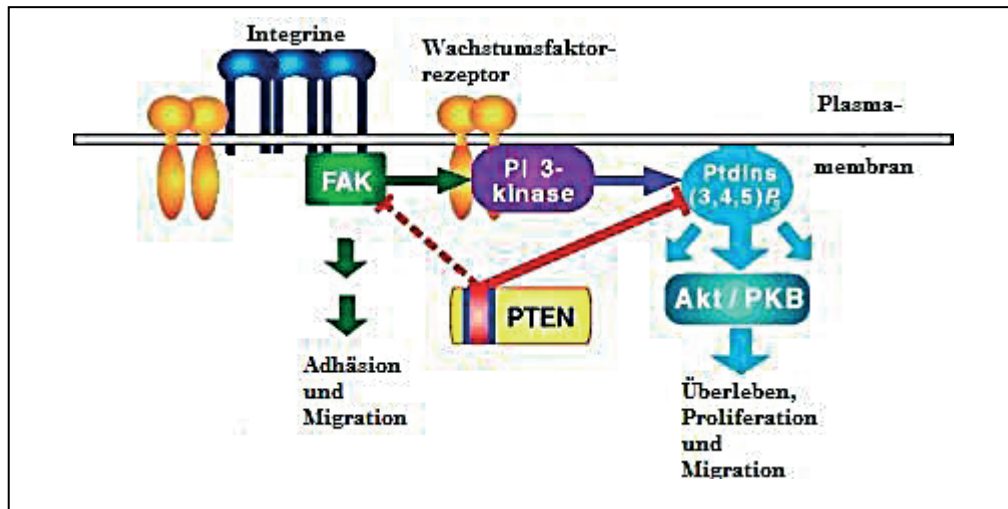


Abbildung 4: Wirkungsbereiche von PTEN

Extrazelluläre Wechselwirkungen initiieren die Signaltransduktion von Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Als Hauptfunktion von PTEN wird die Herabregulation des PI3K-Produktes PtdIns(3,4,5)P₃ angesehen, welches Akt (auch als PKB bezeichnet) und komplexe stromabwärts gelegene Signalwege von Zellwachstum, Überleben und Migration beeinflusst. Zusätzlich hat PTEN eine schwache Protein-Tyrosin Phosphatase-Aktivität, welche möglicherweise u.a. mit FAK interagiert und auf diese Weise andere komplexe Signalwege moduliert. Die Phosphatase-Domäne (rot) reguliert durch Dephosphorylierung (rote Linien) die Substratmoleküle herab. (modifiziert nach YAMADA und ARAKI)^{72, 77}

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Phosphatase PTEN in der frühen Phase des Remodelings nach Ballondilatation untersucht werden. Da vor allem in dieser Phase die initiale Endothelschädigung zu Apoptose führt und für das spätere Ausmaß der Proliferation maßgeblich entscheidend ist, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Evaluation des Einflusses von PTEN auf Apoptose und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).

Dazu wurden Gefäßproben aus einem Restenosemodell der Ratte untersucht. Ein weiteres Augenmerk lag in der Beurteilung des Einflusses von PTEN auf zellulärer Ebene durch *in vitro*-Experimente mit humanen Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (VSMC) und glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten (VSMC).

Ggf. sollten dann im Weiteren die beteiligten Regulationsmechanismen sowie deren Abhängigkeit von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Akku Pipettierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt
Chamber Slide	LAB-TEK, Rochester, New York
Biofuge Fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Deckgläser 24 x 36 mm	MENZEL, Mumbai, India
Elisa-Platte (96 Loch Platte)	GREINER BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Elektrophoresekammer	BIO-RAD, München
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Flexer Cell Zellkultur-Platten	DUNN LABORTECHNIK, Asbach
Grobwaage	SARTORIUS, Göttingen
High Voltage Power Pack P30	BIOMETRA, Göttingen
Hyperfilm ECL	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kehlheim
Mikrotiterplatte	GREINER, Frickenhausen
Nitrozellulose Blot-Membran	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Photometer Genesys 5	SPECTRONIC, Leeds, United Kingdom
Pipetten 10, 100µl	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Polypropylen Röhrchen 15 ml/50 ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenkassette	AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kehlheim
Serologische Einmalpipetten	BECKTON DICKINSON, Heidelberg
Sterile Zellkultur-Arbeitsbank	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
SuperFrost®Plus Objektträger	R. LANGENBRINK, Emmendingen
Transwell-Platten	CORNING INCORPORATED, Corning NY USA
Mini-Blot Gelapparatur	BIO-RAD, München
Whatman-Filterpapier	SCHLEICHER&SCHÜLL, Dassel
Zellschaber	GREINER BIO- ONE GmbH, Frickenhausen

Zentrifuge Hettich Roxita /RP

HETTRICH ZENRIFUGEN, Tuttlingen

3.2 Chemikalien

30 % Acrylamidstammlösung

ATBS- Substratlösung

(“2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt”)

Roche, Penzberg

(8 % Bisacrylamid)

ROTH, Karlsruhe

Ammoniumpersulfat

SIGMA, Steinheim

Antikörper Reagenzlösung

ZYMEDLABORATORIES INC.,
San Francisco, USA

Apoptose-Kit

(In Situ Cell Death Detection Kit”)

ROCHE, Penzberg

Aprotinin

SIGMA, Steinheim

Aqua dest.

BRAUN, Melsungen

BSA (Bovines Serum Albumin)

BIO-RAD, München

Bromphenolblau

ROTH, Karlsruhe

Zellproliferations- Elisa (BrdU colorimetic)

ROCHE, Penzberg

DAPI-Fluoreszenzfarbstoff

(4',6-Diamidino-2-phenylindol)

ROCHE, Penzberg

Dulbecco's 1x PBS

(Phosphate buffered saline)

PAA LABOR, Linz, Österreich

ECL Plus

(Western Blott n Reagenz)

AMERSHAM PHARMACIA, Braunschweig

Ethanol

RIEDEL-DE HAEN, Seelze

Glycerol

SIGMA, Steinheim

Glycin

ROTH, Karlsruhe

H₂O₂ 30 %

MERCK, Darmstadt

HCl 37,3 % (rauchend)

SIGMA, Steinheim

Isopropanol

MERCK, Darmstadt

Leupeptin

SIGMA, Steinheim

Methanol

RIEDEL DE HAEN, Seelze

2-Mercaptomethanol	SIGMA, Steinheim
„MACselect“-Kit	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
„MACselect“ Magnet und Säulen	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Milchpulver	BIO-RAD, München
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Natrium Deoxycholat	SIGMA, Steinheim
Natrium Orthovanadat	ACROS, Geel, Belgien
10 % „Non-Immune Goat Serum“	Zymed
Ocadaic acid	SIGMA, Steinheim
Formaldehyd)	PFA 4 % (Para-SIGMA, Steinheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	SIGMA, Steinheim
Protein Assay (A,B,C)	BIO-RAD, München
Rainbow marker	AMERSHAM, Braunschweig
SDS ultra pur (Sodium Dodecyl Sulfat)	ROTH, Karlsruhe
TEMED	
(N,N,N,N-Tetra-Methylthylendiamin)	BIO-RAD, München
Trizma Base	SIGMA, Steinheim
Tween 20	
(Polyoxyethylenesorbitan Monolaureat)	SIGMA, Steinheim
„Vectashield Mounting Mediufor Fluorescence	
H – 1000”	Vector, Burlingame, Canada

3.3 Antikörper

Primärantikörper

	PTEN (A2B1) sc-7974 Lot #10903	PTEN (FL-403) sc-9145 Lot # B220	P53 (Pab 240) sc-99 Lot # H 141	P53 (FL-393) sc-6243 Lot # 0103
Wirt	Maus	Kaninchen	Maus	Kaninchen
Isotyp	IgG1 monoklonal	IgG polyklonal	IgG monoklonal	IgG polyklonal
Konz.	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml	200 µg/ml
Verwendete Konz.	1:500	1: 500	1:2 000	1:2 000
Lagertemp.	4-8 °C	4-8 °C	4-8 °C	4-8 °C
Bezug	Santa Cruz	Santa Cruz	Santa Cruz	Santa Cruz

Tabelle 1: Liste der Primärantikörper für Westernblots

	CDK-4 (C-22) sc-260	β-Tubulin (T4026)	Phospho-Akt (Ser473) sc-9272-L	Anti-pan-Akt
Wirt	Kaninchen	Maus	Kaninchen	Kaninchen
Isotyp	IgG polyklonal	IgG monoklonal	IgG polyklonal	IgG polyklonal
Konz.	200 µg/ml	50µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Verwendete Konz.	1:2 000	1:7 000	1:2 000	1:1 000
Lagertemp.	4-8 °C	2-8 °C	4-8 °C	4-8 °C
Bezug	Santa Cruz	SIGMA	Cell Signaling	Santa Cruz

Tabelle 2: Liste der Primärantikörper für Immunhistochemie

Sekundärantikörper Westernblots

	Anti-Maus sc-2005 Lot # H0904	Anti-Kaninchen sc-2004 Lot # H 0284
Isotyp	IgG-HRP	IgG-HRP
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	200 µg/500 µl	200 µg/500 µl
Verwendete Konzentration	1:2 000	1:2 000
Lagertemperatur	2-8 °C	2-8 °C
Bezug	Santa Cruz	Santa Cruz

Tabelle 3: Liste der Sekundärantikörper für Westernblot

Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

	Alexa Fluor 488 Anti-Maus	Alexa Fluor 546 Anti-Kaninchen
Isotyp	IgG (H + L)	IgG (H + L)
Wirt	Ziege	Ziege
Konzentration	2 mg/ml	2 mg/ml
Verwendete Konzentration	1:200	1:200
Lagertemperatur	2-8 °C	2-8 °C
Bezug	Molecular Probes Eugene, Oregon; USA	Molecular Probes Eugene, Oregon; USA

Tabelle 4: Liste der Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

3.4 Inhibitoren Aktivierungsassay

Substanz	Hemmung	Konzentration	Hersteller
BpV potassium bisperoxo (bipyridin) oxovanadat	PTEN	200 nM	Merck/Calbiochem Darmstadt
LY 294002	PI3-Kinase	50 µg	Merck/Calbiochem Darmstadt

Tabelle 5: Liste der Inhibitoren für Aktivierungsassay

3.5 Small interfering RNAs (siRNAs)

Primer

Gen	Spezies	siRNA-Duplex Sequenz	Bezug
siCONTROL Non-targeting siRNA # 2		REV 5' -CTC CGA GAT AGC AGG GAA TG- 3	Dharmacon
siPTEN „smart pool“ siRNA	Human	Sequenz wird von der Fa. Dharmacon nicht bekannt gegeben	Dharmacon

Tabelle 6: Liste der siRNAs für transiente “Gene- downregulation”

3.6 *in vivo*-Experimente

3.6.1 Biologische Materialien

Es wurden histologische Gefrierschnitte der A. carotis communis von männlichen Wistar-Ratten der Firma Harlan Winkelmann, Borchern, Deutschland verwendet. Die Gewinnung der Gefäßquerschnitte erfolgte am etablierten Modell in unserer Arbeitsgruppe durch Ballondilatation der A. carotis communis der Ratten mit dem Ziel der Induktion einer neointimalen Proliferation durch Verletzung der endothelialen Gefäßwand. Ausgewachsene Wistar-Ratten (300 g Körper-gewicht) wurden dazu narkotisiert (35 mg/kg Ketamin, Inresa, Freiburg, Deutschland, 5 mg/Kg Xylazin, AstraZeneca, Wedel, Deutschland).

Die Ballondilatation erfolgte an der A. carotis communis der Ratte mittels eines 2 F Ballonkatheters (Edwards Lifescience, Unterschleissheim, Deutschland), der kurz vor Erreichen des Aorten-bogens mit 2,5 ml Luft gebläht wurde. Der Katheter wurde dreimal durch den gesamten Carotisstamm geführt. Ziel dieser Maßnahme war die Verletzung der endothelialen Gefäßwand zur Induktion einer neointimalen Proliferation. Anschließend wurde der Ballonkatheter entfernt und die proximale A. carotis externa unterbunden mittels eines 4-0 Fadens (Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien). Die Wunde wurde verschlossen, die Analgesie erfolgte mit Buprenorphin (0,5 mg/kg, Essex Pharma, München, Deutschland). Die Ratten wurden in den Tierstall zurückgesetzt und erhielten standardisiertes Rattenfutter und Wasser. Nach 12 Stunden wurden die Ratten euthanisiert durch eine Überdosis Isofluran (Baxter, Unterschleissheim, Deutschland).

Alle Vorgänge wurden durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen, Dezernat II 24.3 Veterinärwesen genehmigt und haben die Kriterien der NIH Richtlinien (Guide for the Care und Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 86-23. rev. 1985) erfüllt (Tierversuchsantragsnummer: GI 20/10- Nr. 34/2000).

Zur immunohistochemischen Beurteilung wurden die Arterien 12 Stunden nach Gefäßdilatation entnommen, in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und in Tissue Tek OCT (Miles Laboratories, Naperville, IL) eingebettet. Es erfolgte dann die Anfertigung serieller Querschnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm. Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde der Kryostat LEICA CM 1900 verwendet. Die Betriebstemperatur des Kryostates lag bei ca. -25 Grad Celsius. Das Präparat konnte nun auf einen Objektträger übertragen werden und stand somit für immunhistochemische Verfahren zur Verfügung. Die

Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop DMRB der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland).

3.6.2 Proteingewinnung

Für die Proteingewinnung wurden drei Aa. Carotidae communes entfernt, gepoolt und in RIPA-Puffer lysiert. (PBS, 1 % NP-40, 0,5 % Sodium Deoxycholate, 0,1 % SDS, 10 µg/mL PMSF, 30 µg/mL Aprotinin, 1 mol/L Sodium Orthovanadat).

3.6.3 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC), die durch enzymatische Verdauung aus Aorten von 7 bis 8 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Breeding Laboratories, Kingston, New York) nach der Methode von Owens et al. gewonnen und in Kultur gehalten wurden, sowie Gefäßquerschnitte der A. carotis communis von Ratten 12 Stunden nach Gefäßverletzung verwendet.

VSMC wurden in 10 %igem FBS/DMEM/F12-Medium kultiviert. Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 7 - 12 verwendet. Die konfluenten Zellen wurden trypsinisiert und in gefelderte Objektträger (chamber slides) mit je vier Feldern umgesetzt. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und die gekammerten Objektträger mit kaltem PBS zweimalig gespült. Anschließend erfolgte sowohl für die Zellen aus der Zellkultur als auch für die Gefäßquerschnitte der Carotiden die Fixierung mit kaltem 4 %igem PFA für 20 Minuten im Kühlschrank.

3.6.4 Nachweis apoptotischer Zellen *in situ*

Der Nachweis apoptotischer Zellen *in situ* erfolgte mit Hilfe des „In situ Cell Death Detection Kit“ (Tunel Assay) der Firma Roche. Es wurde nach dem originalen Protokoll vorgegangen. Das „In-situ Cell Death Detection Kit“ ist eine präzise, schnelle und einfache radioaktivfreie Technik, um apoptische Zellen einzeln und in Geweben zu lokalisieren und zu quantifizieren. Das Prinzip des Testes beruht auf der Tatsache, dass während der Zellteilung doppelsträngige, niedermolekulare DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche mit hohem Molekulargewicht entstehen. Diese DNA-Strangbrüche können durch freie 3'-OH-Endungen mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion identifiziert werden. Das verwendete TUNEL-Kit (Terminal desoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) besteht aus einer Enzymlösung, die die terminale Deoxynucleotidyltransferase enthält und aus einer Label-Lösung, die eine Nukleotid-Mischung in einem Reaktionspuffer enthält.

Die 6 µm dicken Gefrierschnitte der A. carotis communis sowie die chamber slides mit den VSMC wurden nach der Fixierung über 20 Minuten in 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend wurden sie für 2 Minuten bei 4 °C in eine Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat in PBS) gestellt. Nach 2 Waschgängen in PBS erfolgte die Zugabe von 50 µl TUNEL Reaktionslösung, die kurz vorher zusammengemischt wurde, pro Schnitt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37 °C.

Nach 3 weiteren Waschgängen in PBS wurden die Schnitte mit einem DAPI-enhaltenen Mounting-Medium (1 µl DAPI auf 1 ml Mounting Medium) eingedeckelt.

Die Anzahl apoptotischer Zellen konnte nun anhand ihrer Grünfluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei einer Wellenlänge von 450 - 500 nm durch einfaches Auszählen bestimmt werden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte durch Auszählen der DAPI-positiven Zellen. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde dann zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt, wodurch die Apoptoserate bestimmt werden konnte.

3.6.5 PTEN-Färbung *in situ* und *in vitro*

Die Gefrierschnitte der A. carotis communis sowie die chamber slides mit den VSMC wurden nach Fixierung über 20 Minuten in 4 % PFA 15 Minuten in PBS rehydriert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 10 %-igem „Non-Immune Goat Serum“ zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 10 Minuten. Nach Abklopfen des Serums erfolgte die jeweilige Primär-Antikörpergabe in einer Konzentration von 1:10 verdünnt in „Antibody-Diluent“ (Molecular Probes, Leyden, Niederlande), auf die entsprechenden Kammerfelder mit 150 µl/ Feld. Der Primär-Antikörper wurde abgedunkelt und geschützt auf den Feldern für eine Stunde belassen. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 Minuten mit PBS gereinigt.

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper („Alexa fluor goat anti-rabbit 488®“) erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 ebenfalls in Antikörperlösung (Molecular Probes, Leyden, Niederlande) und auf die entsprechenden Kammerfelder aufgetragen. Unter Lichtschutz wirkte der Sekundär-Antikörper für eine Stunde ein. Als Kontrolle diente der in einem Feld aufgetragene fluoreszierende Sekundär-Antikörper ohne Primär-Antikörper.

Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang in PBS-Lösung für zweimal 5 Minuten. Um eine Ausbleichung der Zellkerne unter fluoreszierendem Licht zu verhindern, wurden die

Objektträger mit „Vectashield Mounting Medium for Fluoreszenz H-1000“ und DAPI (5 µg/ml, Linaris, Wertheim, Deutschland) benetzt und mit einem Deckglas bedeckt. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA und Zellkernen eingesetzt wird. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica.

3.7 *in vitro*-Experimente

3.7.1 Zellkultur

Humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (VSMC) wurden von der Firma Cambrex® (Verviers, Belgien) bezogen. Die Kultivierung erfolgte im Wachstumsmedium „Smooth Muscle Cell Growth Medium -2 (Firma PromoCell®)“ mit Zusatz von Penicillin (10'000 U/ml) und Streptomycin (10'000 µg/ml).

Entsprechend der Fragestellung wurden die Zellen mit oder ohne 500 µM H₂O₂ und mit oder ohne Zusatz des PTEN-Inhibitors Kalium- bisperoxo(bipyridin)oxovanadat (bpV, 50 nM), in Wachstumsmedium mit 10 % FCS mit oder ohne den Phosphoinositol-3-Kinase-Inhibitor (PI3-K) LY 294002 (50 µM) inkubiert. Der Ruhezustand der Zellen wurde durch Inkubation mit Medium ohne Wachstumsfaktoren (Basalmedium) über 48 Stunden herbeigeführt. Hierbei kommt es durch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zur „Synchronisation“ der Zellen, Es wurden ausschließlich Zellen bis Passage 3 bis 8 verwendet.

3.7.2 Isolierung von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte

Primärkulturen glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden durch enzymatische Verdauung aus Aorten von 7 bis 8 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Breeding Laboratories, Kingston, New York) nach der Methode von Owens et al. gewonnen. Die VSMC wurden in 10 %igem FBS/DMEM/F12-Medium kultiviert. Der Ruhezustand der Zellen wurde ebenfalls durch Inkubation mit Basalmedium über 48 Stunden herbeigeführt. Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 3 bis 8 verwendet. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an der sterilen Zellkultur- Arbeitsbank und mit sterilen Materialien und Lösungen durchgeführt.

3.7.3 Quantifizierung der Apoptoserate

Apoptotische Zellen wurden mit dem „Cell Death Detection ELISA Plus“ (Cat. No. 11774425001, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) analysiert. Dies ist ein photometrischer Enzym-Immunoassay Kit zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von apop-

totischen Zellen. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. (<https://www.roche-applied-science.com>).

Die in 96-well-Platten wachsenden Zellen wurden mit 200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt, ohne dabei das Pellet am Boden zu schütteln. Anschließend wurden die Zellen mit Lyse-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und erneut mit 200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 20 µl des Lysates wurden dann in die Mikrotiterplatte mit dem Assay gesetzt und 80 µl des frisch präparierten Immunoreagents zugefügt. Die Platte wurde dann bei Raumtemperatur für 2 Stunden unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig durch Klopfen entfernt und jedes Feld jeweils 3 x mit 250 µl des Inkubationspuffers gereinigt. Es wurden dann 100 µl „ABTS“-Lösung in jedes Feld pipettiert und auf einem Schüttler bis zum grünen Farbumschlag bei Raumtemperatur inkubiert. ATBS ist ein Substrat einer wasserlöslichen Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*), die zu einem grünen Farbumschlag führt. Die Messung erfolgte bei 405 nm mit der ABTS Lösung als Leerkontrolle, mit einer Wellenlängenreferenz von 490 nm.

3.7.4 Zellproliferation

Um den Einfluss von PTEN auf das Proliferationsverhalten von VSMC zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: Zum einen die direkte Zählung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Kammer und zum anderen die Anwendung eines Zellproliferations-ELISA (BrdU-ELISA). Für die direkte Bestimmung der Zellzahl wurden glatte Gefäßmuskelzellen auf Sechsfach-Zellkulturplatten ausgesät, pro Loch 35.000.

Nach 48 Stunden Kultivierung in Wachstumsmedium wurde die Zellzahl einer dieser Platten durch Auszählen in der Neubauer-Kammer bestimmt. Diese Zahl diente als Anfangszellzahl und wurde als 100 % gesetzt. Die restlichen Zellen wurden erneut mit Wachstumsmedium stimuliert und je nach Kondition mit verschiedenen Konzentrationen der Phosphatase PTEN (10, 50 und 100 µM) versetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurde auch deren Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer bestimmt.

Der Zellproliferations-ELISA beruht auf dem Prinzip, dass nach Zugabe des Pyrimidin-analogons BrdU (Bromdesoxyuridin) dieses anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Für diesen Versuch wurden humane Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (VSMC) auf 96well Mikrotiter-Platten ausgesät, pro

well 7 000 Zellen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen durch serumfreies Medium ruhend gesetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe der Inhibitoren.

Nach weiteren 24 Stunden wurde Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben, um sie zur Proliferation durch im Medium enthaltene Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Auch jetzt erfolgte die erneute Zugabe der Inhibitoren. 20 Stunden nach Beginn der Proliferation wurden 10 µl/well „BrdU-labeling solution“ auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte über 4 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde das Medium entfernt und es erfolgte die Zugabe von 200 µl/well Methanol, durch die die DNA denaturiert wird. Dieser Schritt ist notwendig, damit das inkorporierte BrdU von einem Antikörper erreicht werden kann.

Die Fixierungslösung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Nach dem Entfernen der Lösung durch vorsichtiges Klopfen wurden 100 µl/ well „anti-BrdU working solution“ auf die Zellen gegeben. Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 3-mal mit 200 µl Waschpuffer gespült.

Die jetzt gebildeten Immunkomplexe konnten mit Hilfe einer Substratlösung sichtbar gemacht werden. 100 µl dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur für 20 bis 30 Minuten auf den Zellen belassen. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt. Mit Hilfe eines ELISA-Readers konnte die Farbentwicklung bei 405 nm quantifiziert werden. Die entwickelte Farbe und somit die Absorption korreliert direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit der Anzahl proliferierenden Zellen.

3.7.5 Western Blot

Proteinbestimmung:

DC Protein Assay der Firma BioRad (www3.bio-rad.com)

Reagent A (Katalog-Nr.: 500-0113)

Reagent B (Katalog-Nr.: 500-0114)

Reagent S (Katalog-Nr.: 500-0115)

RIPA Puffer:

1 x	PBS ohne Calcium und Magnesium
1 %	NP 40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS
	ad 500 ml H ₂ O, Lagerung bei +4° C

Inhibitoren (bei jedem Ansatz frisch hinzugeben)

10 µl/ml	von 10 mg/ml PMSF in Isopropanol
30 µl/ml	Aprotinin
10 µl/ml	100 mM Natrium Orthovanadat
1 µg/µl	Leupeptin in H ₂ O
10 mM	Okadaic acid in H ₂ O

5 x Elektrophoresepuffer

15 g	Tris
72 g	Glycin
5 ml	10 %iges SDS
	pH 8,3, ad 1000 ml H ₂ O

10 x Probenpuffer

3,3 ml	3,75M Tris pH 6,8
2 g	SDS
5 ml	Glycerol
3 mg	Bromphenolblau
1 ml	2-Mercaptomethanol
	ad 10 ml

Transferpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS (optional)

Strippingpuffer

100 mM Mercaptoethanol

62,5 mM Tris pH 6,8

2 % SDS

Waschpuffer

1 x PBS

0,1 % Tween 20 (vor Gebrauch zugeben)

pH 7,6

ad 1 Liter H₂O

Blocklösung

1 x PBS

0,1 % Tween

7,5 % Magermilchpulver

PBS

10x 1,4 M NaCl

27 mM KCl

98 mM Na₂HPO₄ xH₂O

14,7 mM KH₂PO₄

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Sammelgel

5 %:

Aqua dest.

30 % Acrylamid Stammlösung

1 M Tris (pH 6,8)

10 % Natrium(Sodium)Dodecylsulfat (SDS)

10 % Ammoniumpersulfat

Temed

Trenngel

10 %:

Aqua dest.

30 % Acrylamid Stammlösung

1,5 M Tris (pH 8,8)

10 % SDS

10 % Ammoniumpersulfat

Temed

Präparation der Zelllysate

Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältlicher Assay (DC Protein Assay der Firma BioRad) verwendet, der auf der modifizierten Methode nach Lowry beruht.

BSA (Bovines Serum Albumin 0,17 µg; 0,35 µg; 0,7 µg; 1,4 µg) wurde als interner Standard verwendet, um den Proteingehalt in µg/µl zu bestimmen. Der RIPA-Puffer wurde als extra Probe gemessen und das Ergebnis vom Proteingehalt der Proben abgezogen. Von den Proben wurden 5 µl in je eine Küvette gegeben. Die Proben wurden mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt und in alle Küvetten wurde 25 µl Reagenz A' (1000 µl Reagenz A, 20 µl Reagenz S) und 200 µl Reagenz B zugegeben.

Nach 15 Minuten Inkubationszeit war der Farbumschlag nach blau abgeschlossen und die maximale Absorption bei 750 nm konnte mittels eines Photometers bestimmt werden. Jede

Proteinbestimmung erfolgte doppelt, um so Pipetierungenauigkeiten durch das Bilden eines Mittelwertes zu minimieren.

Gelprobenaufbereitung

Alle folgenden Schritte der Proteinaufbereitung fanden auf Eis statt. Pro Probe wurden 20 µg Gesamtprotein eingesetzt. Das der Proteinmenge entsprechende Lysat-Volumen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, ein zweifach konzentrierter Ladepuffer zugegeben und bis auf das gewünschte Endvolumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Das im Ladepuffer enthaltene SDS umhüllt bei diesem Schritt die Proteine und versieht sie so entsprechend ihrer Länge mit einer negativen Ladung.

Ein Gewichtsstandard aus Proteinen unterschiedlicher Größe, welche später auf dem Gel sichtbare Banden bilden, wurde wie die Lysate aufbereitet und in einer Tasche des Gels parallel zu den Proben geladen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben 5 Minuten gekocht.

Herstellung eines zweischichtigen Polyacrylamidgels (SDS-Page) nach Laemmli (1970)

Das System nach Laemmly besteht aus einem oberen Sammelgel und einem darunter anschließenden Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine während der Elektrophorese zunächst konzentriert, um dann im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt zu werden. Sammel- und Trenngel wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, um später in die Mini-gelapparatur eingespannt zu werden. Zwischen den beiden Platten verhinderte eine Gummidichtung das Auslaufen der Gele. Die zu untersuchenden Moleküle wandern in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid dient dazu, diese Polymere zu vernetzen. So entstehen Gele unterschiedlicher Porengröße zur Separation unterschiedlich großer Proteine. Als Katalysator wird hierbei TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat eingesetzt.

Die Zutaten für das Trenngel wurden in einem Polypropylen-Röhrchen gemischt. Nach dem Start der Polymerisation durch die Zugabe von 10 % APS und TEMED wurde das Gel sofort zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Nach einer halben Stunde wurde das Sammelgel auf die gleiche Weise hergestellt, das Trenngel damit überschichtet und ein Kunststoffkamm zur Formung der Ladetaschen eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war

(ca. 1 - 2 Stunden), wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Minigelapparatur eingespannt.

Elektrophorese

Während der Elektrophorese wandern Moleküle entsprechend ihrer Ladung und ihrer Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung der angelegten Spannung. Die Elektrophorese dient so der Separation unterschiedlicher Moleküle, um deren spezifischen Nachweis zu erleichtern. Die Porengröße des Polyacrylamidgels und das zugegebene SDS sind hierbei für die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Proteine nach ihrer Größe verantwortlich.

Die Elektrophoresekammer des verwendeten vertikalen Systems besteht aus einer oberen und einer unteren Kammer. Das zwischen den beiden Glasplatten befindliche Gel bildet die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern und gewährt den Stromfluss von Kathode zu Anode. Nach Befüllung der Kammern mit Elektrophoresepuffer wurden die aufbereiteten Gelproben in die entsprechenden Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief mit 90 V über einen Zeitraum von einer Stunde. Die sichtbaren Banden des Gewichtsstandards zeigten hier die ausreichende Laufweite der Proteine an.

Für den weiteren Nachweis wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und auf eine etwa gleich große Nitrozellulosemembran gelegt. Nach 15-minütigem Equilibrieren in Transferpuffer wurden Gel und Membran in einer Klemmvorrichtung in der Blotkammer fixiert. Die Proteine wurden unter einer Spannung von 90 V über eine Stunde aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die nach dem Blot auf der Membran erkennbaren farbigen Gewichtsstandards dienten als Kontrolle für einen effektiven Transfer. Die Membran wurde entweder direkt für die weitere Immundetektion verwendet oder bei +8 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Immundetektion

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubieren in 5 % fett-freiem Milchpulver in einfachem (1 x) Waschpuffer über eine Stunde geblockt. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration in Milchpulver-lösung verdünnt für eine Stunde auf die Membran gegeben.

Um nichtgebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend 3 x 10 Minuten in Waschpuffer geschwenkt und der Überstand verworfen. Jetzt wurde der Sekundär-

antikörper in der entsprechenden Konzentration nach den Angaben des Herstellers für eine Stunde auf die Membran gegeben und es erfolgte ein neuer Waschgang.

Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mittels eines verstärkten Chemilumineszenz-Systems (ECL+) der Firma Amersham. Die Membran wurde für 5 Minuten in der ECL+ Lösung inkubiert, wobei die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase; HRP) die lumineszierende Lösung aktivierte. Anschließend wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einem hochsensitiven Röntgenfilm (Kodak) für 30 Sekunden bis 2 Minuten, abhängig vom entsprechenden Antikörper, exponiert und der Film entwickelt.

3.7.6 Plasmide und Transfektion

Die Transfektion wurde mit Hilfe der kationischen Lipidreagenz „Fugene“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

SMC mit einer ~50 %-Konfluenz wurden vorübergehend mit dem entsprechenden siRNA - Plasmid transfiziert.

Die Zellen wurden kotransfiziert, in dem der Zellkultur equimolare Mengen des pMACS K^k II- Plasmids und des Plasmids mit der kodierenden Sequenz (pPTEN) des zu untersuchenden Proteins in einem Verhältnis von 1:3 zugegeben wurden.

Für eine 35 mm Zellkulturschale wurden 6 µl Liposomen zu 100 µl Opti-MEM (Gibco Brl, Rockville, Maddison; USA) hinzugegeben und mit 2 µg Plasmid- DNA gemischt.

Die Zellen wurden mit WT-PTEN-cDNA oder Akt-cDNA (konstitutive aktive Form) im Plasmid pUSEamp (Q61L Mutant; Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, USA) zusammen mit dem pMACS KK^{II} Plasmid (1:3) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) inkubiert, welches für die magnetische Trennung der kurzzeitig transfizierten Zellen benötigt wird.

Dieses Gemisch wurde dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf Zellen mit serumfreien Medium pipettiert. Nach 4 Stunden erfolgte die Zugabe von Wachstumsmedium. Mit dieser Methode konnte eine Transfektionseffizienz von 20 – 30 % erreicht werden. Anschließend wurde das Medium durch 5 % iges FCS ersetzt.

Für jede durchgeführte Transfektion wurden folgende Transfektionskontrollen eingesetzt:

- a) nicht transfizierte Zellen
- b) mock transfection (ohne siRNA, jedoch mit lipid carrier) zur Detektion von zellulären Effekten, die durch den Transfektionsvorgang ausgelöst werden
- c) Transfektion mit einer anderen siRNA (siControl) non-targeting siRNA (siControl) zur Detektion von *off-target* Effekten.

Die Experimente mit transfizierten Zellen werden 48 bis 72 Stunden nach Transfektion durchgeführt.

3.7.7 Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)

Nach 24 Stunden wurden die transfizierten Zellen trypsinisiert und mit magnetischen MAC-Select K^k -II Micro Beads (www.miltenyibiotec.com) zur Markierung für 15 Minuten inkubiert. Die erfolgreich transfizierten Zellen (K^k -II positiven) und nicht transfizierten Zellen (K^k -II negativen) wurden mit Hilfe von MS+/RS+Säulen (MILTENYI BIOTEC), welche einem magnetischen Feld ausgesetzt wurden, selektiert und anschließend in 96well-Platten erneut ausgesät.

Die positiv selektierten Zellen waren zu >85 % positiv für die K^k-II Expression.

Nach 12 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-haltigem Medium. Die weitere Bearbeitung der Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Cell Proliferating ELISA, BrdU. Die Inkubation mit der BrdU- Markierungslösung erfolgte allerdings für 8 Stunden bei 37 °C. Mit Hilfe eines ELISA- Readers konnte anschließend die Menge der synthetisierten DNA bestimmt werden.

3.7.8 RNA-Interferenz

SMC mit einer Konfluenz von 50 % wurden vorübergehend mit dem entsprechenden siRNA-Duplex transfiziert. Hierzu wurde „Lipofectamine 2000“ (Katalog-Nr.: 11668-027; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. SiRNAs sind kurze 21-23 Nukleotide lange, doppelsträngige RNAs. Sie verbinden sich mit einer zu ihnen komplementären aktiven mRNA und bilden einen so genannten RISC-Komplex. Dies führt

dazu, dass diese mRNA durch Ribonuklease H abgebaut wird oder doch zumindest an der Translation gehindert wird. Man nennt diese Hemmung antisense-mediated inhibition (antisense, weil ein kurzes Stück der auszuschaltenden mRNA zu ihr komplementär ist). Mit Hilfe von siRNA (short interfering RNA) kann man die Expression bestimmter Proteine ausschalten. Als Kontrolle dient eine unspezifische RNA (siRNA-Control).

Für jeweils eine 24-Felderplatte wurde die siRNA in 50 µl „OptiMEM I Reduced Serum“-Medium verdünnt und die siRNA mit einer Endkonzentration von 10 nM verwendet. Die Menge des verwendeten „Lipofectamine 2000“ für eine Transfektion betrug 0.5 µl, verdünnt in 50 µl OptiMEM I.

Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die verdünnte siRNA mit verdünntem Lipofectamine 2000 vermischt und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die 100 µl Komplex-Lösung wurde anschließend mit 400 µl Wachstumsmedium (ohne Antikörper) kombiniert und in jedes Zellen enthaltende Feld zugefügt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Transfektion der siRNA und deren Kontrollen wurden bei jedem Versuch folgendermaßen durchgeführt: Nicht transfizierte Zellen (NT), mock transfection (ohne siRNA, jedoch mit Lipidcarrier), Transfektion mit einer nicht-zielgerichteten siRNA (siControl) zur Detektion von unspezifischen Effekten, Transfektion mit einer siRNA gegen PTEN (siPTEN). Die Experimente mit transfizierten Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt.

3.7.9 Phosphatase-Assay

Der Phosphatase-Assay ist ein Verfahren, mit dem man die Aktivität einer Serin/Threonin oder -Tyrosinkinase photometrisch bestimmen kann.

Die Phosphatasereaktionen wurden in 50 µl Assay-Pufferlösung, die 100 mM TrisHCL pH8, 10 mM DTT und 200 mM wasserlösliches diC8-PIP3 (Echelon, Salt Lake City, USA) enthält, durchgeführt.

Die Reaktionen enthielten PTEN-Protein, welches durch Immunpräzipitation auf Protein A/G-Agarose-beads mit anti-PTEN-Antikörpern (Santa Cruz Laboratories, USA) gebunden war, entweder von dilatierten oder nicht-dilatierten Carotiden aus isolierten oder kultivierten SMC. Als Kontrolle dienten entweder IgG-Iso-Antikörper ohne spezifische Zielproteine oder Proben ohne Zusatz eines Antikörpers.

Im Anschluss an eine Immunopräzipitation eines spezifischen Proteins von 250 ng über Nacht, wurden die “beads“ dreimal in einem Puffer, der 20 mM HEPES (pH 7.7), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA und 2.5 mM MgCl₂ enthält und einmal in Phosphatase-Assay-Puffer ohne PIP₃, gewaschen.

Die Proben wurden für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert und auf eine 96-Felderplatte gesetzt. Die Freisetzung von Phosphaten aus dem Substrat wurde in einem colorimetrischen Assay mit Biomol Green Reagent (Biomol, Hamburg, Deutschland) nach Herstellerangaben gemessen. Der Absorptionsgrad wurde bei 650 nm auf einem ELISA-Reader bestimmt. Eine Standardkurve wurde bei jedem Assay verwendet. Die Menge des freigesetzten Phosphates wurde im Vergleich zu der Standardkurve abgelesen.

3.8 Statistik

Die aufgeführten Daten wurden mit Exel 2000 (Microsoft) und Sigma Plot 8.0 mit Sigma Stat 2.03 (Systat, Erkrath, Deutschland) analysiert.

Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA I, der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte nach Holm-Sidak.

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Nach Gefäßverletzung ist die Expression von PTEN vermehrt

Das Phänomen der überschießenden Zellproliferation mit den Folgen der Restenose nach Ballondilatation ist seit den Anfängen der PTCA bekannt. Daraus haben sich bereits einige therapeutische Ansätze entwickelt (Drug-eluting-Stents, etc.), die jedoch bisher nicht die optimale Lösung darstellen. Das Verständnis der molekularen Zusammenhänge hinsichtlich apoptotischer und proliferativer Vorgänge in VSMC kann dazu beitragen, die unerwünschten Folgen der PTCA zu minimieren.

Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag daher in der Charakterisierung des Verhaltens und der Bedeutung der Lipidphosphatase PTEN nach Gefäßverletzungen *in vivo*. Zu diesem Zweck erfolgte die Untersuchung an Gefäßquerschnitten der A. carotis communis von Ratten. Diese wurden einer Ballondilatation an der A. carotis communis unterzogen. Nach mehrfachem Durchführen des Katheters und darausfolgender Verletzung der endothelialen Gefäßwand zur Induktion einer neointimalen Proliferation, wurden nach Entnahme und Präparation serielle Gefäßquerschnitte am Kryostaten hergestellt. Somit standen diese für immunhistochemische Verfahren zur Verfügung. Die Gefrierschnitte wurden mit dem Primärantikörper gegen PTEN und dem entsprechenden immunfluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert.

Im Bereich von schwerwiegenden Verletzungen der Intima in den dilatierten Gefäßen und besonders in der apoptotischen Media von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), die sich von der intakten Gefäßwand durch einen Mangel an intakter DAPI-gefärbter Nuclei in der geschädigten Region unterscheidet, zeigte sich eine besonders starke Expression von PTEN (grün) in den apoptotischen glatten Muskelzellen (TUNEL – gefärbt rot). (Abb. 5 A und B). Die erhöhte PTEN-Expression nach Gefäßverletzung konnte außerdem durch Immunblots, die die Proteinexpression von Lysaten aus dilatierten und nicht-dilatierten Gefäßen zeigen, bestätigt werden. (Abb. 5 C). Diese Erhöhung der Proteinexpression war über eine Zeitperiode von 24 Stunden nachweisbar.

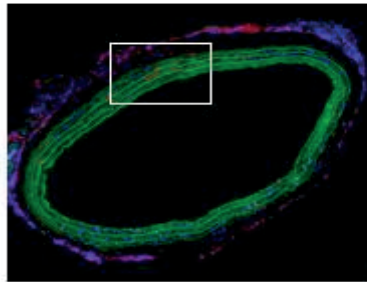


Abbildung 5 A:

PTEN- Expression und apoptotische Zellen *in situ*

Repräsentative Schnitte einer verletzten Gefäßwand einer A. carotis von Ratten 12 Stunden nach Ballondilatation. Grün dargestellt die PTEN-Färbung, apoptotische glatte Gefäßmuskelzellen (TUNEL-Färbung, rot) und Nuclei (DAPI, blau).

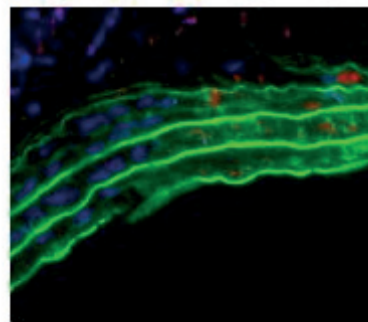


Abbildung 5 B:

Repräsentatives Bild , das einen Ausschnitt aus Abbildung A in einer 4fachen Vergrößerung zeigt. Die Läsion kann deutlich von der intakten Gefäßumgebung unterschieden werden durch das Fehlen der DAPI-gefärbten Nuclei in der geschädigten Region.

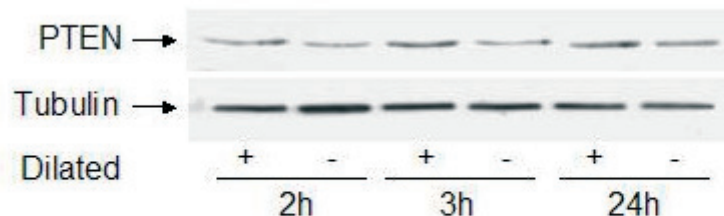


Abbildung 5 C:

Die PTEN-Proteinmenge ist vermehrt nachweisbar in dilatierten Aa.carotidae communes von Ratten *in vivo* wie hier im Westernblot mit einem spezifischen PTEN-Antikörper gezeigt. β -Tubulin dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Probenbeladung.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Gefäßdilatation einen Effekt auf die Aktivität der Phosphatase PTEN hat.

Unter Verwendung eines Phosphatase-Assays mit Protein, welches von Homogenaten aus drei gepoolten Aa. carotidae communes stammt und PIP₃ als Substrat verwendet, konnte gezeigt werden, dass die PTEN-Aktivität in dilatierten Gefäßen nach 12 Stunden deutlich stärker war als in nicht-dilatierten Arterien ($1,35 \pm 0.1$ vs 0.125 ± 0.025 ; *P < 0.05; Abb. 5 D).

Dies lässt vermuten, dass die Proteinexpression und Aktivitätssteigerung von PTEN maßgeblich an dem Prozess der Apoptose beteiligt sein und diese möglicherweise sogar induzieren könnte.

Immunpräzipitationen mit IgG-Iso-Antikörpern und Immunpräzipitationen ohne Zusatz eines Antikörpers wurden als Negativkontrollen verwendet.

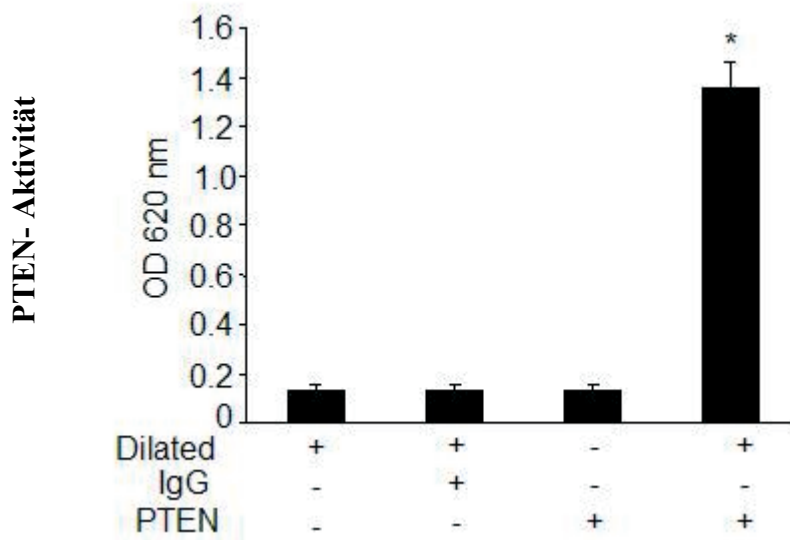


Abbildung 5 D:

Die Aktivität von PTEN ist nach der Gefäßverletzung verstärkt. Hier ist ein Phosphatase-Aktivitäts-Assay dargestellt unter Verwendung eines immunpräzipitierten Proteins aus Lysaten von dilatierten und nicht-dilatierten Aa. carotidae communes von Ratten. Als Kontrolle wurden Immunpräzipitate mit IgG-Iso-Antikörpern und Immunpräzipitate ohne Zusatz eines Antikörpers verwendet. Die Ergebnisse wurden dargestellt bei einer durchschnittlichen OD 620 + SEM mit einem ELISA-Reader (*P<0.05, n = 3)

4.2. Die endogene Expression von PTEN während des Wachstums und der Apoptose von VSMC

4.2.1 Die Protein-Expression von PTEN ist bei proliferierenden Zellen im Zeitverlauf unverändert

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die endogene Expression von PTEN unter Wachstumsbedingungen einer zeitlichen Regulation unterliegt und hieraus mögliche Schlüsse gezogen werden können.

VSMC wurden daher mit 10 %-igem FCS über 24 Stunden stimuliert und die Protein-Expression im Westernblot dargestellt. Es zeigte sich keine spezifische zeitliche Regulation der PTEN-Expression.

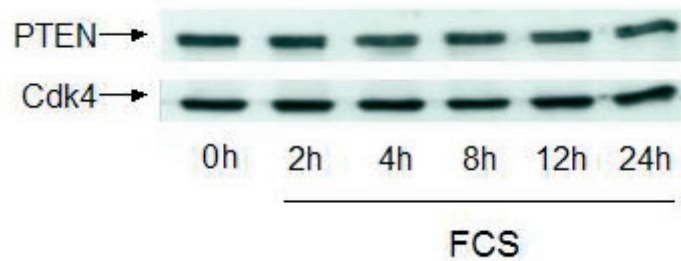


Abbildung 6 A:

PTEN-Expression unter FCS-Stimulation im Westernblot

Lysate von VSMC, die Wachstumsmedium ausgesetzt wurden (FCS).

Die PTEN-Expression ist nicht hochreguliert nach 24 Stunden. Die Proteinmengen wurde im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen PTEN dargestellt. Cdk4 diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung.

4.2.2 Die PTEN-Expression ist in apoptotischen Zellen vermehrt

Da von anderen Arbeitsgruppen bekannt ist, dass Signaltransduktionswege in Gefäßzellen durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und Wachstumsfaktoren reguliert werden ^[86, 87], untersuchten wir, ob eine Serumstimulation und/oder H₂O₂ in einer Steigerung der PTEN-Proteinmenge in VSMC *in vitro* resultiert.

Die Expression von PTEN wurde durch Immunblots von PTEN analysiert, die aus einer Zellkultur von VSMC nach Stimulation mit 10 % FCS (Abb. 6 A) oder Inkubation mit 500 µM H₂O₂ für 24 Stunden (Abb. 6 B) stammten. Zuvor wurden die Zellen 48 Stunden durch wachstumsfaktorfreies Medium „synchronisiert“ und dadurch in einen Ruhezustand überführt.

Es zeigte sich, dass H_2O_2 die PTEN-Expression zeitabhängig stärker beeinflusst als fetales Serum, so dass angenommen werden kann, dass oxidativer Stress Voraussetzung ist für eine Hochregulation von PTEN.

Die übereinstimmende Hochregulation von p53, einem bekanntem Induktor für Apoptose, zeigt, dass die PTEN-Expression vom programmierten Zelltod nach Stressinduktion begleitet ist. Cdk4 diene als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Proben.

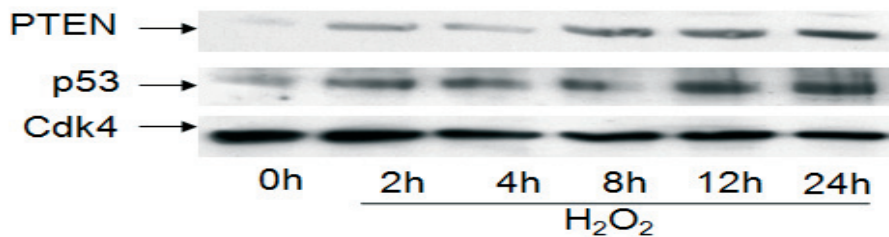


Abbildung 6 B:

Lysate von VSMC, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden durch 500 μM H_2O_2 .

Die PTEN-Expression wurde durch oxidativen Stress innerhalb von 24 Stunden getriggert. p53 diente als apoptotischer Marker.

Im darauf folgenden Phosphatase-Assay wurde die Aktivität von PTEN unter Einfluss mit und ohne H_2O_2 beobachtet. Die Ergebnisse des Phosphatase-Assays mit PTEN nach Immunpräzipitation von Homogenaten kultivierter VSMC zeigen, dass die Aktivität nach 12-stündiger Behandlung mit H_2O_2 deutlich angestiegen ist im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (1.35 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.04 ; $*P < 0.001$; Abb. 6 C).

Die erhöhte Aktivität konnte durch den PTEN-Inhibitor bpV in einer Konzentration von 50 nM auf das Level von Immunpräzipitaten mit einem unspezifischen IgG-Antikörper reduziert werden.

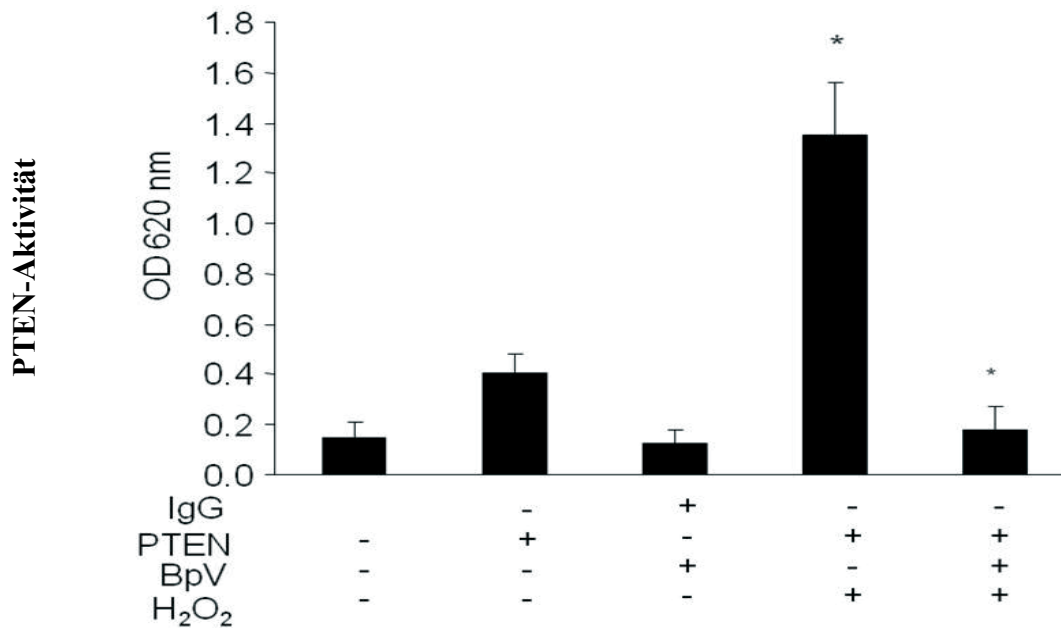


Abbildung 6 C:

Die Hochregulation der PTEN-Aktivität wird durch H₂O₂ vermittelt. Dargestellt ist ein Phosphatase-Aktivitäts-Assay von immunpräzipitierten Proteinen aus Lysaten von VSMC mit und ohne 12-stündige Behandlung mit H₂O₂ (* P< 0.001, n = 3).

Immunpräzipitationen von Lysaten mit IgG-Iso-Antikörpern ohne H₂O₂-Behandlung mit und ohne bpV-Supplementation, ein Anti-PTEN-Antikörper ohne H₂O₂ und bpV-Behandlung und ein Anti-PTEN-Antikörper mit H₂O₂ und bpV-Behandlung dienten als Kontrollen.

Die Ergebnisse sind dargestellt bei einer durchschnittlichen OD 620 + SEM mit einem ELISA-Reader.

4.3 Überexpression von PTEN verstärkt die Apoptose von VSMC

Die vorausgegangenen Versuche zeigten, dass die Proteinexpression und Aktivität von PTEN nach Gefäßverletzung *in vivo* sowie in der H₂O₂-induzierten Apoptose *in vitro* deutlich gesteigert ist. Der Einfluss der beobachteten Hochregulation von PTEN auf die Apoptoserate von VSMC war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Zu diesem Zweck wurde PTEN in VSMC mit einem Plasmid, welches für die WT-Form von PTEN in VSMC kodiert, überexprimiert und die Apoptoserate in ruhenden und proliferierenden Zellen mittels eines TUNEL-Assays bestimmt. Es zeigte sich, dass die Überexpres-

sion von PTEN sowohl in ruhenden als auch in proliferierenden VSMC eine signifikant gesteigerte Apoptoserate zur Folge hatte (20.0 % + 5.0 vs. 5.0 % + 3.0; *P < 0,05; Abb. 7 A).

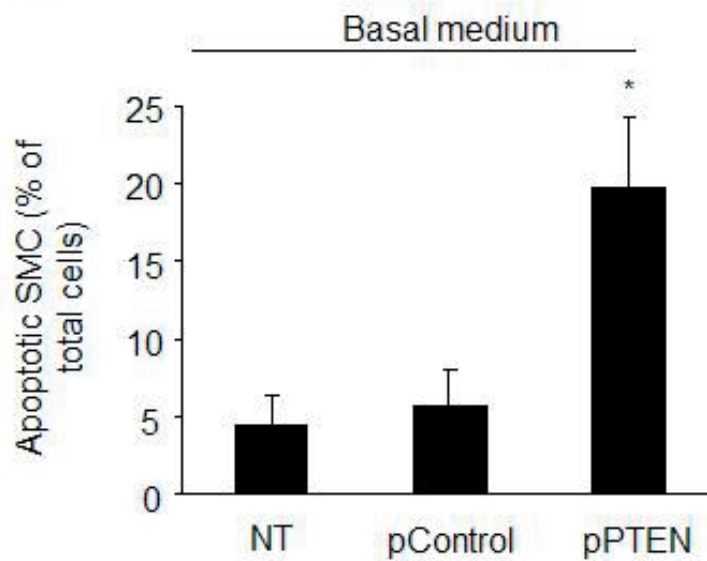


Abbildung 7 A:

Einfluss von PTEN-Überexpression auf die Apoptoserate bei VSMC

Das Diagramm zeigt die Apoptoserate der Zellen unter den verschiedenen Konditionen. Die Apoptoserate wurde bestimmt, indem die TUNEL-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl der Zellen ins Verhältnis gesetzt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Überexpression von PTEN eine signifikant gesteigerte Apoptose zur Folge hat.

VSMC wurden wie folgt transfiziert: nichttransfiziert (NT), mit einem leerem Plasmid ohne PTEN-cDNA (pControl), Transfektion mit einem Plasmid, welches für PTEN kodiert (pPTEN).

Durch einen Apoptosestimulus mit H_2O_2 (500 μ Mol) konnte die Apoptoserate in den PTEN-überexprimierten Zellen zusätzlich beträchtlich gesteigert werden ($25 \% \pm 5.0$ vs $45.0 \% \pm 6.0$; * $P < 0.05$; Abb.7 B).

Die relative Anzahl von apoptotischen Zellen wurde mit Hilfe eines TUNEL-Assays bewertet, ausgedrückt in Prozent der Gesamtzellzahl (* $P < 0.05$, $n=4$).

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Überexpression von PTEN die basale und H_2O_2 -induzierte Apoptose verstärkt. Als Vergleich dient ein leerer Kontrollvektor.

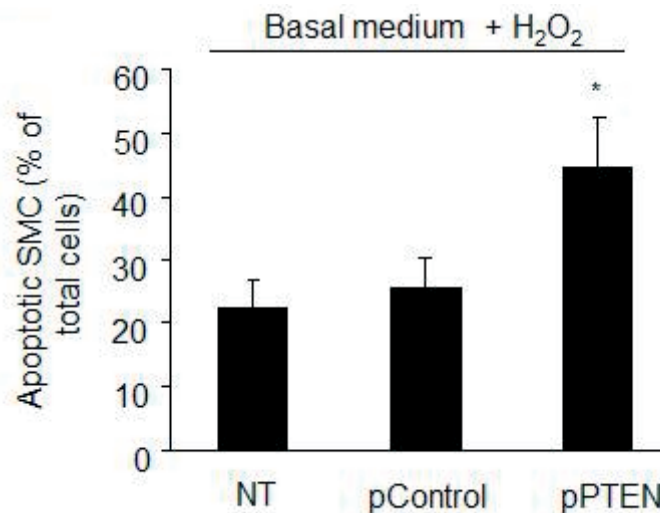


Abbildung 7 B:

Einfluss von PTEN-Überexpression auf die Apoptoserate durch zusätzlichen Apoptosestimulus. Das Diagramm zeigt die Apoptoserate der Zellen unter den verschiedenen Konditionen und Inkubation mit 0,5 µMol H₂O₂. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Überexpression von PTEN eine signifikant gesteigerte Apoptose besonders unter oxidativem Stress zur Folge hat (20.0 % ± 5.0 vs. 5.0 % ± 3.0; *P < 0,05; Abb. 7 A und 25 % ± 5.0 vs 45.0 % ± 6.0; *P < 0.05; Abb. 7 B). Die relative Anzahl von apoptotischen Zellen wurde mit Hilfe eines TUNEL bewertet, ausgedrückt in Prozent der Gesamtzellzahl (*P < 0.05, n=4).

Um den Zusammenhang zwischen Apoptose und Proliferation von VSMC näher zu beleuchten, wurde in einem weiteren Versuch die Proliferation von VSMC mittels eines BrdU-Inkorporations-Assays bestimmt. VSMC wurden mit einem Plasmid transfiziert, welches WT-PTEN oder einen Kontrollvektor mit GFP beinhaltet und für 24 Stunden in Wachstums-medium in Anwesenheit von BrdU inkubiert. VSMC wurden wie folgt transfiziert: mock (Transfektion ohne Plasmid, aber mit Transfektion-Reagenz), Transfektion mit einem Plasmid, welches GFP kodierte (pGFP), Transfektion mit einem Plasmid, welches PTEN kodierte (pPTEN).

Hierbei zeigte sich, dass es durch Überexpression von PTEN zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation von VSMC gekommen ist. Diese Ergebnisse wurden durch Analyse des BrdU-Assays bei OD von 405 nm bewertet (Abb. 8), (0.7 ± 0.08 vs. 0.9 ± 0.15 ; *P < 0.05).

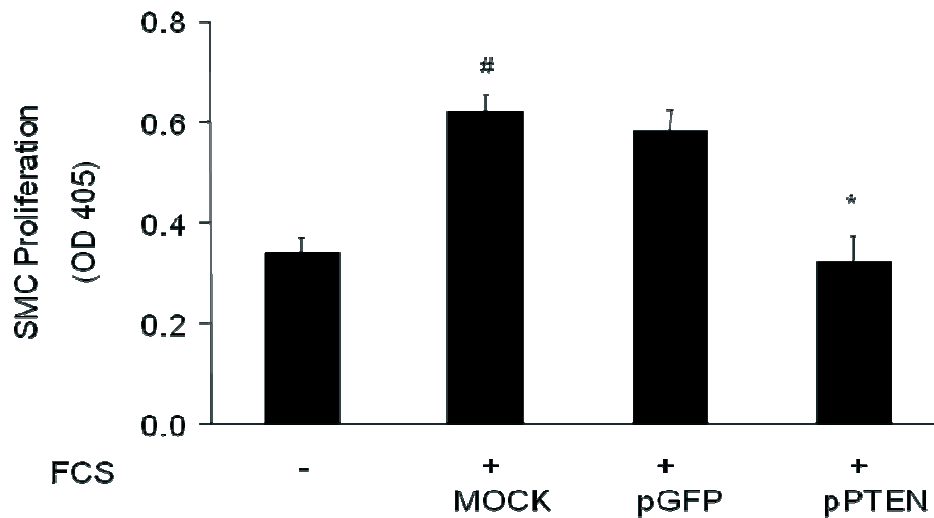


Abbildung 8:

Die Abbildung stellt die Ergebnisse des BrdU-Incorporation-Assay dar.

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden über 24 h in Basal- und Wachstumsmedium kultiviert. Es zeigt sich eine Abnahme der Proliferation der mit FCS-stimulierten PTEN-überexprimierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Eine Überexpression von PTEN verhindert eine Proliferation von VSMC unter basalen Bedingungen.

Durch diese gewonnenen Ergebnisse lässt sich zeigen, dass eine Überexpression zu einer gesteigerten Apoptoserate und reduzierten Proliferation (BrdU) der Zellen führt. Die Ergebnisse belegen somit einen sowohl pro-apoptotischen als auch anti-proliferatorischen Effekt von PTEN in glatten Gefäßmuskelzellen.

4.4 Knockdown von PTEN reduziert die Apoptoserate von VSMC

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, führt eine selektive Überexpression von PTEN zu einer verstärkten Apoptose und reduzierten Proliferation von VSMC. Folgerichtig müsste im Umkehrschluss eine selektive Ausschaltung (*Knock-down*) von PTEN mittels einer siRNA zu einer reduzierten Apoptose und einer verstärkten Proliferation von VSMC führen.

Die Entstehung von Restenosen und Atherosklerose ist bekannterweise maßgeblich durch das Verhältnis von Proliferation und Apoptose beeinflusst. Um zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren zu können, untersuchten wir zunächst, ob si-PTEN in der Lage ist, die Apoptoserate bei serumfrei-gehaltenen und zusätzlich oxidativem Stress ausgesetzten Zellen zu beeinflussen. Humane glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien wurden über 48 Stunden mit der spezifischen siRNA gegen PTEN (si-PTEN 30 nM) inkubiert und mit FCS stimuliert.

Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen (NT), transfizierte Zellen ohne siRNA (MOCK) sowie eine Kontroll-siRNA mit scrambled siRNA(40 nM) verwendet. Die basale und H₂O₂-induzierte Apoptose von VSMC wurde 48 Stunden nach Transfektion unter Verwendung eines „Cell death detection ELISA“ bei einer Wellenlänge von 405 nM bestimmt. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Apoptoserate (0.22 ± 0.1 vs. 0.12 ± 0.1 ; * $P < 0.05$, und 0.32 ± 0.15 vs. 0.12 ± 0.08 ; * $P < 0.05$; Abb.9 A).

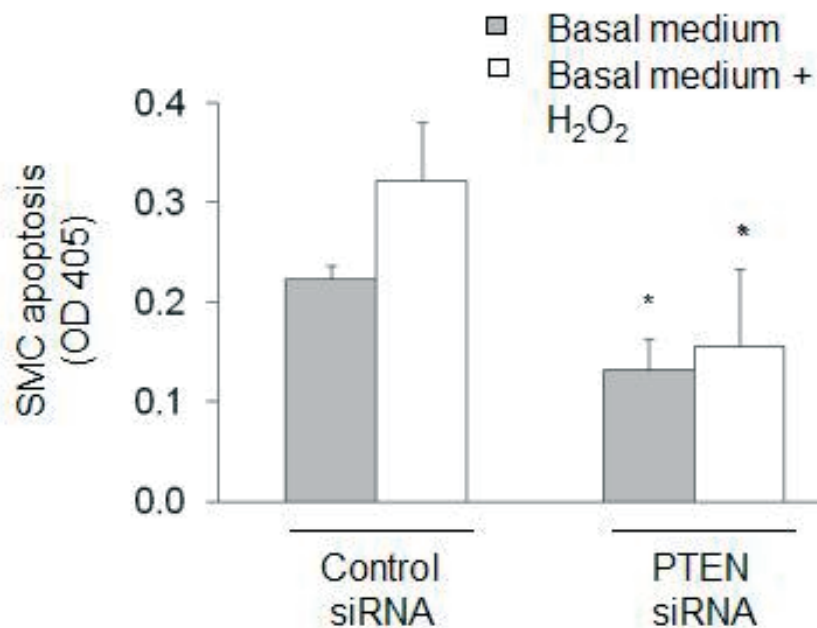


Abbildung 9A:

Einfluss von si-PTEN auf die Apoptoserate von VSMC

Das Diagramm zeigt die Apoptoserate der Zellen unter den verschiedenen Konditionen.

PTEN-Knockdown schwächt die Apoptose von VSMC unter basalen Bedingungen, aber insbesondere unter oxidativem Stress. VSMC, die mit einer siRNA gegen PTEN oder einer „scrambled“ Kontrolle transfiziert wurden, wurden in Basalmedium ohne H₂O₂ und mit H₂O₂ (500 µM) inkubiert. Die apoptotischen Zellen wurden bei einer durchschnittl. OD 405 + dargestellt mit Hilfe eines Cell death detection ELISA (* $P < 0.05$, n=4).

Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Behandlung mit si-PTEN zu einer verminderten Apoptoserate vor allem bei den zusätzlich H₂O₂-ausgesetzten Zellen führt.

Als Zeichen der tatsächlichen Herunterregulation der PTEN-Expression auf Proteinebene zeigte sich im Western-Blot ein vollständiger Verlust der PTEN-Expression (siehe Abb.9 B).

Die Spezifität der siRNA gegen PTEN wurde durch eine fehlende Regulation von house-keeping Proteinen (Cdk4) dokumentiert.



Abbildung 9 B Westernblot

Spezifischer Knock-down der PTEN-Expression auf Proteinebene

Die Westernblot-Analyse zeigt eine spezifische Herunterregulation der PTEN-Expression auf Proteinebene nach Inkubation mit siRNA gegen PTEN bei fehlender Regulation der housekeeping-Banden. Cdk4 diente als Nachweis für eine gleiche Proteinbeladung der einzelnen Proben und housekeeping-Protein.

VSMC wurden wie folgt transfiziert: nichttransfiziert (NT), mock-transfected (ohne siRNA, aber mit Lipidcarrier) Transfektion mit einer nicht-zielgerichteten siRNA (control siRNA) und Transfektion mit einer gegen PTEN gerichteten siRNA (PTEN siRNA).

4.5 SiRNA gegen PTEN führt *in vitro* zu einer Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen

Zur Analyse der Anzahl proliferierender Zellen wurde ein BrdU-Assay unternommen. Die Zellen wurden jeweils nach Inkubation mit einer Kontroll-siRNA (40 nM) und der spezifischen siRNA gegen PTEN (30 nM) über 24 Stunden in serumfreien oder FCS-haltigem Medium kultiviert. In dieser Situation zeigte sich explizit bei den mit siRNA gegen PTEN inkubierten und mit FCS-stimulierten Gefäßmuskelzellen eine signifikante Zunahme der Proliferation von VSMC.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse des BrdU-Incorporation-Assay dar. Die Behandlung der VSMC mit siPTEN resultierte in einer signifikanten Steigerung der DNA-Replikation verglichen mit der Kontrollgruppe ($0,52 \pm 0,1 \%$ vs $0,11 \pm 0,03 \%$; $0,128 \pm 0,01 \%$ vs $0,05 \pm 0,02 \%$; $p < 0,002$).

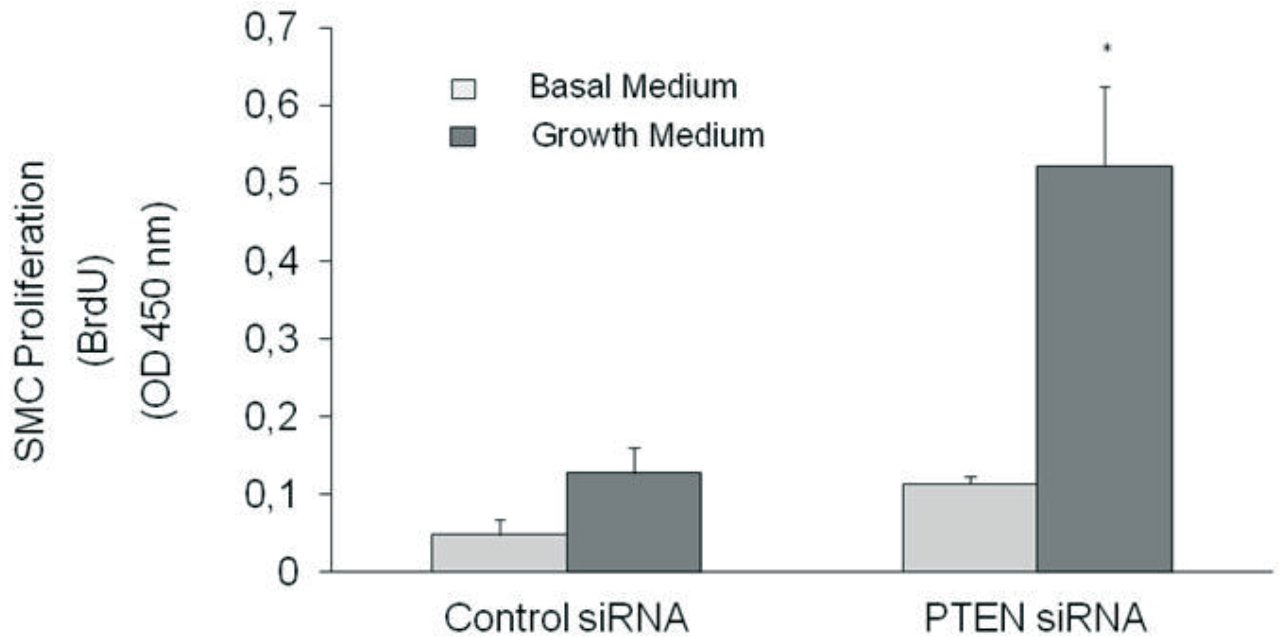


Abbildung 10:

Einfluss von si-PTEN auf die Proliferation von VSMC

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 h in basalem, serumfreien Medium (BM) und in Wachstumsmedium (GM) mit PTEN und si-PTEN, unter Zugabe von BrdU inkubiert. Die Proliferation wird bestimmt im -ELISA, und ist angegeben als durchschnittliche Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die dabei ermittelte Absorption korreliert direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit der Anzahl proliferierender Zellen. Eine Inkubation der Zellen mit siRNA gegen PTEN führt zu drastisch gesteigerter Proliferation im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Dieser Effekt wird bei den FCS-stimulierten Zellen gegenüber den serumfreien Zellen besonders deutlich.

Diese Ergebnisse beweisen, dass eine gezielte Ausschaltung von PTEN durch siPTEN maßgeblich die Zahl der proliferierenden Zellen steigert.

4.6 Überexpression von PTEN verhindert dieseserum-vermittelte Akt- Phosphorylierung und wirkt somit pro-apoptisch

Um die zu Grunde liegenden Mechanismen der beobachteten pro-apoptischen Effekte von PTEN genauer zu untersuchen, analysierten wir die Akt-Phosphorylierung. Akt ist mit einer Vielzahl nachgeordneter Signalmoleküle in die Regulation multipler Prozesse wie den Zellmetabolismus, die Proteinsynthese, die Proliferation oder die Apoptose involviert und hinlänglich bekannt für seine anti-apoptischen Effekte in unterschiedlichen Zelltypen^[88, 89].

Wie in Abbildung 11 dargestellt, verhindert eine Überexpression von PTEN eine serum-induzierte Phosphorylierung von Akt bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit. Dies wurde mit Hilfe eines Immunoblots unter Verwendung eines Antikörpers gegen p-Akt, gezeigt. Die

Akt-Phosphorylierung wird somit durch Aktivierung von PTEN gehemmt; ein Prozess, der zu verstärkter Apoptose in VSMC führt.

Die Hemmung der PI3-K durch Verwendung des pharmakologischen Inhibitors LY 294002 (50 $\mu\text{mol/l}$) verhindert ebenfalls die serum-induzierte Phosphorylierung von Akt (Abb. 11). Damit zeigt sich, dass die PI3-K ein für die Modulation der Akt-Funktion vorgeschalteter wichtiger Regulator ist.

Repräsentative Kontrollen für nichttransfizierte Zellen, für MOCK (nur Transfektionsreagenz ohne Plasmid), der leere Vektor und das Kontrollplasmid ohne PTEN zeigen deutlich die Akt-Phosphorylierung.

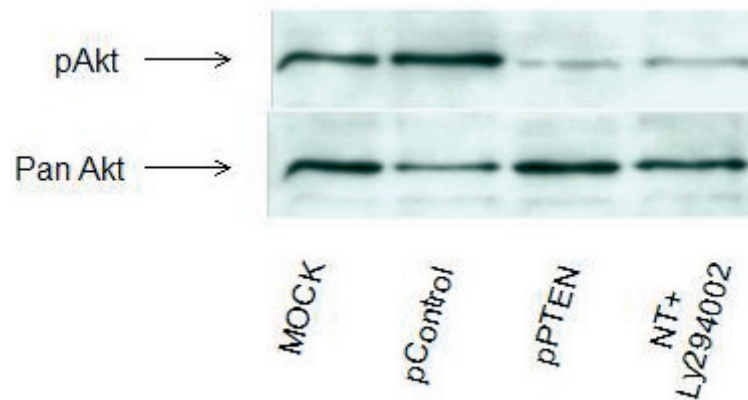


Abbildung 11:

Eine Überexpression von PTEN verhindert eine serum-induzierte Akt-Phosphorylierung nach Inkubation von 15 Minuten mit 10 %igem FCS. Die Bestimmung erfolgte im Westernblot mit einem anti-pAkt-Antikörper. Ein Antikörper gegen Akt wurde als Kontrolle verwendet. Der potente PI3-K-Inhibitor LY 294002 (50 nM) wurde dem Medium für die nichttransfizierten Zellen zugefügt.

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenspiels von PTEN und Akt in Hinblick auf die Apoptose führten wir eine parallele Transfektion von PTEN und Akt durch mit Hilfe von zwei Plasmiden; eine Wildtyp-Form von PTEN (WT) sowie eine konstitutiv-aktive Form von Akt. Zu diesem Zweck wurden VSMC mit den entsprechenden Plasmiden ko-transfiziert und mittels Magnetselektion separiert. Als Kontrolle diente ein leeres Plasmid. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe eines „Cell Death Detection ELISA“ 48 Stunden nach Transfektion bestimmt.

Es zeigte sich, dass der anti-apoptotische Effekt in VSMC von Akt durch PTEN aufgehoben werden kann. Dieses ist bei den Kontrollzellen, die lediglich mit dem PTEN-Plasmid transfiziert wurden, nicht möglich (0.88 ± 0.08 vs. 0.9 ± 0.15 ; $*P < 0.05$; Abb. 12).

Dieses Ergebnis legt also nahe, dass der Apoptose-induzierende Effekt von PTEN möglicherweise darin begründet ist, dass Akt nicht mehr so stark aktiviert wird und infolge nicht mehr so stark anti-apoptotisch wirken kann. Dies verdeutlicht umso mehr, dass PTEN als Gegenspieler von Akt pro-apoptotisch auf VSMC wirkt und die weitreichende proliferative Wirkung von Akt eingrenzt.

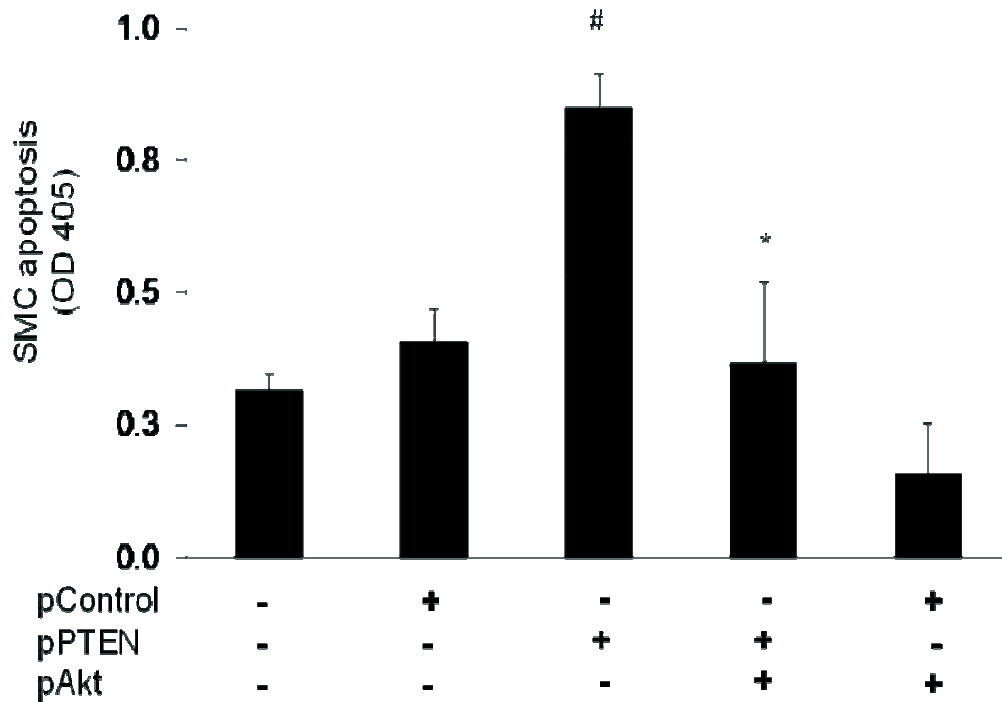


Abbildung 12:

PTEN- und Akt-Co-Überexpression kehrt den pro-apoptotischen Effekt von PTEN um. VSMC wurden mit einer WT-Form von PTEN und konstitutiv-aktiven Form von Akt ko-transfiziert. Ein leeres Plasmid wurde als Kontrolle verwendet. Nach magnetischer Separation von positiv-transfizierten SMC, wurde die Apoptose nach einem Zellwachstum von 24 Stunden bestimmt und dargestellt bei einer durchschnittlichen OD 405 + SEM mit Hilfe eines Cell death detection ELISA (*p<0.01, n= 4)

5. Diskussion

5.1 Nach Gefäßverletzung ist die Expression von PTEN vermehrt

In der hier vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Lipidphosphatase PTEN auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten von glatten Gefäßmuskelzellen *in vivo* nach Gefäßverletzung mittels Ballondilatation sowie in der Zellkultur *in vitro* untersucht werden, da diesem Vorgang neben der Migration und Inflammation eine Schlüsselfunktion in der Entstehung der vaskulären Restenose zukommt. Nach Ballonangioplastie kann es durch eine verstärkte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu einer Intima- und Mediahyperplasie kommen, die zu einer erneuten Gefäßverengung, der Restenose, führt. [2, 3, 30, 49, 84, 90-92]. Wie weitere Untersuchungen belegen, wird durch mechanischen Stress auf glatte Gefäßmuskelzellen Apoptose in der Tunica media ausgelöst, über die dann im weiteren Verlauf eine Hyperplasie der Intima entsteht [20, 23].

Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass besonders die in der frühen Phase nach Ballondilatation entstehende Apoptose von VSMC maßgeblich das spätere Ausmaß der neugebildeten Intima, der sogenannten Neointima beeinflusst.

Durch mechanischen Stress auf VSMC kommt es unter anderem über eine gesteigerte p53-Expression zu einer verstärkten Apoptose in VSMC und einem simultanen raschen Anstieg der Cystein-Protease Calpain. *In vivo* führte eine Hemmung der initialen Calpain-Aktivität nach Ballondilatation zu einer verstärkten Apoptose von VSMC innerhalb von 24 Stunden und zu einer signifikanten Zunahme der späteren Formation der Neointima. Calpain wirkt der mechanisch-induzierten Apoptose von VSMC durch Degradierung von p53 entgegen und stellt somit einen Schlüsselpunkt im mechanosensitiven Remodeling-Prozess der Gefäßwand dar [23].

Bisher existieren nur wenige Berichte über die Funktion von PTEN direkt nach Gefäßverletzungen. Daher habe ich mich zunächst auf die Expression direkt nach der Gefäßverletzung konzentriert. In der Media von unverletzten Aa. carotidae communes von Ratten zeigte sich eine konstante PTEN-Expression. In der nachfolgenden Gefäßverletzung konnte eine Hochregulation der PTEN-Expression in VSMC in der Media beobachtet werden. Weiterhin konnten wir unter Verwendung eines Phosphatase-Assays zeigen, dass die Phosphataseaktivität von PTEN nach Gefäßdilatation gesteigert ist.

Interessanterweise ist die gesteigerte PTEN-Expression und Aktivität begleitet von einem gesteigertem apoptotischen Zelltod der entsprechenden VSMC.

Anschließende Immunblot-Analysen von PTEN in kultivierten VSMC zeigen, dass die Hochregulation von PTEN durch H_2O_2 stärker gesteigert ist als durch mitogene Stimulation (Serumstimulation).

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten einer kürzlich erschienenen Studie, die die Auswirkungen von nukleärer PTEN-Akkumulation unter H_2O_2 -Einfluss beleuchtet und einen p53-vermittelten Wachstumsarrest in G1 feststellt^[93]. PTEN ist normalerweise im Cytoplasma lokalisiert, aber es konnte ebenso im Nucleus von differenzierten oder ruhenden Zellen sowie im Endometrium während des Hormonzyklusses^[94-96] detektiert werden. Bei Abfall der nukleären PTEN-Konzentration kommt es zum Fortschreiten von Schilddrüsenkarzinomen und Melanomen^[97]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nukleäres PTEN die Stabilität von Chromosomen und die DNA-Reparatur kontrolliert^[98].

Diese Daten lassen vermuten, dass die Lokalisation von PTEN im Nucleus ein dynamischer Prozess ist und verbunden ist mit Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zellschutz. Reaktive Sauerstoffspezies haben (ROS) ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf Wachstum von glatten Muskel- und Endothelzellen sowie das zelluläre Überleben und sind somit in den patho-physiologischen Prozess des Remodelings der Gefäßwand eingebunden^[87, 99, 100].

Während geringe Mengen an oxidativem Stress eher das Wachstum von VSMC begünstigen, führt vermehrter und andauernder oxidativer Stress im Verlauf zum (programmierten-) Zelltod von VSMC.

H_2O_2 führt zu Zelltod durch Apoptose oder Nekrose, insbesondere unter pathophysiologischen Konditionen wie Entzündung und Reperfusion nach Ischämie^[101]. Letzteres steht in Übereinstimmung mit unseren Daten^[102, 103].

Endogene reaktive Sauerstoffspezies bewirken neueren Erkenntnissen nach eine Anreicherung von APE1/Ref-1 im Nucleus. APE1/Ref-1 ist ein bedeutender Redox-Regulator in eukaryotischen Zellen. Diese Anreicherung ist verbunden mit einer Aktivierung von Egr-1, einer Hochregulation von PTEN und Hemmung des Akt-Signalweges sowie des Zellwachstums^[104, 105].

Egr-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der den PTEN-Promoter reguliert in einer APE-1/Ref-1-abhängigen Weise, wodurch die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress vermittelt wird und zu wachstumshemmenden Effekten führt ^[106].

Unsere Ergebnisse belegen, dass die PTEN-Expression nach Gefäßverletzung hochreguliert und die Phosphataseaktivität verstärkt ist. Interessanterweise ist die PTEN-Expression nur in den apoptotischen Zellen vermehrt, wohingegen die PTEN-Expression in den nicht-apoptotischen Zellen unverändert ist. Dies könnte den Verdacht nahe legen, dass nicht die durch das Trauma apoptotischen Gefäßmuskelzellen PTEN vermehrt exprimieren, sondern dass vielmehr durch vermehrte PTEN-Expression in den durch die Ballondilatation beschädigten Zellen Apoptose verstärkt oder sogar ausgelöst wird.

5.2 PTEN-Expression in den Phasen der Apoptose nach Gefäßverletzung

Wie wir bereits aus Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wissen, kann man zwei Phasen der Apoptose nach Gefäßverletzung unterscheiden, die bedeutend für das spätere Ausmaß des gesetzten Schadens und somit der Prognose sind:

Man unterscheidet eine *frühe Phase der Apoptose*, die Minuten bis Tage nach dem Gefäßtrauma zu einem rapiden Anstieg von apoptotischen Zellen, insbesondere in der Tunica Media, führt sowie eine *späte Phase*, in der es Tage bis Wochen nach Trauma zu einer Migration von VSMC aus der Tunica media in die Intima, dann Neointima genannt, sowie zu einer Proliferation der VSMC in der Neointima kommt mit daraus resultierender weiterer Intimahyperplasie ^[29, 30, 107, 108].

Der initial gesetzte Schaden durch die Ballondilatation führt über die lokal begrenzte Schädigung der glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica Media zu einer Apoptose und darüber hinaus zu einer weiteren Schädigung durch die Einwanderung glatter Gefäßmuskelzellen von der Tunica media in die Intima mit konsekutiver Lumeneinengung.

Langfristig kann sich aus dem Trauma durch Thrombozytenaggregation, Adhäsion, Akkumulation und Aktivierung inflammatorischer Zellen eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand entwickeln ^[19]. Die daraus resultierende Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukine, TNF, MCP-1) und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, bFGF) aktiviert den Zellzykluseintritt glatter Gefäßmuskelzellen und führt neben einer Migration verschiedener Zellen in die Tunica media insbesondere zur weiteren Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen sowie zu chronischen Umbauprozessen in der Gefäßwand (negatives Remodeling), die letztendlich zu

einer definitiven Hyperplasie der Neointima führen. Ist es so weit gekommen, ist eine Kehrtwendung nicht mehr möglich und es resultiert die Restenose.

Insbesondere in der frühen Phase nach Gefäßverletzung ist somit das Ausmaß der Verletzung entscheidend für die Ausbildung der späteren Neointima und somit richtungsweisend für das weitere Schicksal.

Wie aus unseren Experimenten gefolgert werden kann, könnte eine Hemmung von PTEN in der frühen Phase der Apoptose das Ausmaß der lokalen Schädigung mit Apoptoseausbildung reduzieren. Dies könnte in Übereinstimmung stehen mit vorausgegangenen Studien, die das Konzept der frühen trauma-induzierten Apoptose mit daraus resultierender gesteigerter späten Neointimaformation unterstützen ^[23]. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte PTEN jedoch die im Verlauf auftretende Proliferation der VSMC eingrenzen und somit in Folge die Neointimabildung gering halten. Dies stellt möglicherweise einen weitreichenden therapeutischen Ansatz dar und könnte die Prognose der Ballondilatation durch eine reduzierte Restenoserate maßgeblich beeinflussen.

Zusammengefasst resultiert die Hochregulation von PTEN nach Gefäßverletzung in einer verstärkten Apoptose von VSMC und spielt somit eine wichtige Rolle in der frühen Phase des physiologischen Prozesses des Gefäßremodelings nach Angioplastien.

5.2.1 Die Expression von PTEN ist bei proliferierenden Zellen im Zeitverlauf unverändert

Wie gezeigt werden konnte, ist die Expression von PTEN nach Ballondilatation gesteigert. Zur weiteren Beleuchtung der Eigenschaften wurden VSMC in Basalmedium kultiviert und mit 10 %igem FCS-haltigem Medium zu definierten Zeitpunkten stimuliert. Insbesondere interessierte uns die Frage, durch welche Stimuli die PTEN-Expression hochreguliert wird und welche Auswirkungen dies auf die Apoptose von SMC hat.

Unter FCS-Stimulation kommt es durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren (nerve growth factor NGF, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-3 (IL-3)) zu einer Aktivierung von PI3-K und Akt. Wie Ergebnisse von Stephens und Insall zeigen, steigt die PIP₃-Konzentration innerhalb von Sekunden bis Minuten an ^[114, 115]. Im Zeitverlauf von 24 Stunden unter Wachstumsbedingungen zeigte sich jedoch keine Regulation der PTEN-Expression in ruhenden sowie proliferierenden Zellen.

5.2.2 Die Expression von PTEN ist in apoptotischen Zellen vermehrt

Um den Zusammenhang zwischen PTEN und apoptotischen Zellen zu beleuchten, ging ich der Frage nach, ob die Expression von PTEN bei apoptotischen Zellen verändert ist. Interessanterweise lässt sich bei VSMC, die mit 500 μM H_2O_2 behandelt und dadurch einem oxidativen Stress ausgesetzt wurden, im Zeitverlauf eine Zunahme der PTEN Protein-Expression im Westernblot feststellen. Als Apoptosemarker diente p53, welches im Zeitverlauf von 24 Stunden parallel zu PTEN vermehrt exprimiert wird. Aber nicht nur die PTEN-Protein-Expression ist gesteigert, sondern wie die Ergebnisse des Phosphatase-Assays mit PTEN nach Immunpräzipitation von kultivierten VSMC zeigen, ist auch die Aktivität von PTEN nach 12-stündiger Behandlung mit H_2O_2 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich angestiegen.

Wie diese Ergebnisse belegen, ist eine verstärkte und Aktivität von PTEN unter apoptotischen Bedingungen im Zeitverlauf zu beobachten. Möglicherweise trägt aber PTEN erst zur H_2O_2 -induzierten Apoptose bei oder verstärkt sie.

5.3. Überexpression von PTEN

Es stellte sich die Frage, ob die vermehrte Expression von PTEN, die nach Gefäßverletzung *in vivo* in den Versuchen *in situ* und *in vitro* nach H_2O_2 -Stimulation sehen, die Apoptose der Zellen beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurde daher eine Überexpression von PTEN mit Hilfe eines Plasmids durchgeführt und das Verhalten der VSMC untersucht.

5.3.1 Überexpression von PTEN verstärkt Apoptose in VSMC

Bisherige Erkenntnisse über PTEN bezüglich Apoptose lassen vermuten, dass PTEN über seine dephosphorylierende Eigenschaft von PIP_3 zu PIP_2 und daraus unterbrochener Akt-Aktivierung, Einfluss auf das Überleben von Zellen nimmt^[116]. Wie Toker und Newton herausfanden, moduliert PTEN die Apoptose über eine Reduktion von PIP_3 , welches seinerseits die Aktivierung von Akt über die phosphoinositol-abhängigen Kinasen PDK-1 und PDK-2 reguliert^[116]. Die Hemmung der “integrin-linked” Kinase (ILK) führt über eine PDK-2-Beeinflussung zur vermehrten Apoptose und zum Zellzyklusarrest, wie die Arbeitsgruppe um Persad herausfand^[117]. Vorarbeiten von Tamura und Yamada belegen, dass eine Herabregulation des PI3K/Akt-„Überlebens“-Signalweges nicht nur durch direkte Dephosphorylierung von PIP_3 , sondern auch durch Inhibierung der im Signalweg vorgeschalteten gelegenen FAK^[82] entstehen kann. FAK ist eine für fokale Adhäsionsstellen

charakteristische Tyrosinkinase, über die die Organisation des Zytoskelettes und Signalübertragungswege zusammengeführt werden.

Weitere Ergebnisse von Bennett belegen, dass die Apoptose von VSMC durch Interaktionen zwischen den lokalen Zell-zu-Zellkontakten und den Cytokinen in der Gefäßwand sowie durch Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen durch die Zelle, wie zum Beispiel Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen reguliert wird^[118]. Wie bereits vorangegangene Untersuchungen zeigen, kann eine Re-Expression von PTEN in einigen Karzinomzellreihen Apoptose direkt induzieren^[119], benötigt aber häufig auch einen apoptose-auslösenden Stimulus^[58]. Für die PTEN-abhängige Apoptose von VSMC gibt es demnach mehrfache Signalwege, die diesen Effekt vermitteln könnten.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass die Überexpression von PTEN in VSMC eine signifikant gesteigerte Apoptoserate zur Folge hat. Somit lässt sich ein pro-apoptotischer Effekt von PTEN nachweisen. Inwiefern eine Überexpression PTEN die Proliferation von VSMC beeinflusst und über welchen Mechanismus dies geschieht, wurde in einem weiteren Versuch untersucht.

5.3.2 Überexpression von PTEN hemmt die Proliferation von SMC

Durch seine Eigenschaft als Phosphatase reduziert PTEN die Spiegel von PIP₃ zu PIP₂ und wirkt somit antagonistisch zur PI3-Kinase, welche die Proteinkinase B (Akt) aktiviert.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von Akt durch PTEN effektiv die Proliferation vaskulärer Zellen über einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus verhindert^[49]. Eine Überexpression von PTEN kann die PDGF-induzierte Phosphorylierung von p70 (s6k), Akt und der Glycogen Synthase Kinase-3-alpha and -beta sowie die basale und PDGF-vermittelte Proliferation von SMC hemmen^[49]. Daraus resultiert ein entsprechender Anstieg der Zellzyklusinhibitoren wie p27^{KIP1} sowie eine reduzierte Phosphorylierung des Retinoblastom Protein (Rb)^[124, 125]. Übereinstimmende Ergebnisse anderer vorausgegangener Studien, die eine PTEN-Überexpression benutzten, zeigten eine Hemmung der Proliferation, Migration und ein gesteigertes Überleben von primären VSMC aus Kaninchen^[49].

Nachfolgende *in vivo*-Experimente belegten, dass eine Adenovirus-vermittelte Überexpression von PTEN in einem Aa. Carotidae-Gefäßmodell von Ratten zu einer Hemmung der neo-intimalen Hyperplasie führt durch Induktion von Apoptose und Hemmung der Zellproliferation^[50]. Weiterhin dämpft eine Adenovirus-vermittelte Überexpression von PTEN die Cuff-

induzierte Neointimaformation durch verringerte Zellproliferation, pro-inflammatorische Cytokinproduktion (C-C chemokine motif ligand 2 (CCL-2), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin-1beta (IL-1 B) sowie durch verstärkte Zellapoptose. Weitere *in vitro*-Studien durch Koide et al. demonstrieren, dass eine Überexpression von PTEN die AngII-induzierte CCL-2-Expression hemmt. Dies wurde durch die PI3-K vermittelt ^[126]. In gleichem Maße hemmt eine Überexpression von PTEN die Migration von Fibroblasten, wohingegen Antisense-Nukleotide gegen PTEN einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten ausüben. Dies geschieht durch Assoziation und Dephosphorylierung von focal adhesion kinase (FAK), von dem ein durch PTEN regulierter Mechanismus der fokalen Adhäsionsstruktur, Zellausbreitung und Beweglichkeit angenommen wird ^[127].

Die Folgen einer verstärkten Wirkung von PTEN durch Überexpression auf die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wurden in weiteren Experimenten untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine durch Überexpression von PTEN ausgelöste signifikant reduzierte Zahl der proliferierenden Zellen. Dies unterstützt eindeutig die Erkenntnis, dass eine Überexpression von PTEN zu einer gesteigerten Apoptoserate sowie einer Reduktion der Proliferationsrate führt und belegt somit einen sowohl pro-apoptotischen als auch anti-proliferatorischen Effekt von PTEN in VSMC.

5.4 Knockdown von PTEN

Da in den vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von PTEN zu einer verstärkten Apoptose und verminderten Proliferation von VSMC führt, lag der Schluss nahe, dass eine Herunterregulation der Expression (*Knockdown*) von PTEN die umgekehrten Ergebnisse zur Folge haben könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde PTEN mit Hilfe einer spezifischen siRNA ausgeschaltet und der Einfluss auf die Proliferation und Apoptose von VSMC untersucht.

5.4.1 Knockdown von PTEN mit si-RNA verstärkt die Proliferation von VSMC

Vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegten bereits die essentielle Bedeutung des durch die PI3-Kinase aktivierten Signalweges, der über eine Aktivierung von Akt zu einer Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt ^[128]. Da PTEN eine Aktivierung von Akt inhibiert, könnte demnach ein gezieltes Ausschalten von PTEN mittels siRNA (*Knockdown*) den inhibierenden Einfluss auf Akt aufheben und Akt könnte seine Wirkung ungehindert entfalten. Die Zellen wurden dazu im ruhenden Zustand sowie nach Stimulation mit Serum (FCS) verglichen.

In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bereits bei zunächst ruhenden Zellen zu einer Zunahme der proliferierenden Zellen unter *PTEN-Knockdown* kommt, besonders aber jedoch bei den durch FCS-stimulierten Zellen. Inwiefern die Apoptoserate von VSMC dadurch beeinflusst ist, wurde in einem weiteren Experiment untersucht.

5.4.2 Knockdown von PTEN mit siRNA hemmt die Apoptose von VSMC

Die Arbeitsgruppe von Huang und Kontos beschrieb in vorausgegangenen Untersuchungen, dass PTEN die Apoptose in VSMC verstärkt ^[49]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen meiner Arbeit, dass eine Überexpression von PTEN zur vermehrten Apoptose von VSMC führt, untersuchte ich weiterhin im Umkehrschluss die Auswirkungen einer Ausschaltung von PTEN mittels siRNA gegen PTEN auf VSMC.

Es zeigte sich tatsächlich eine deutlich geringere Apoptoserate bei den mit si-PTEN behandelten Zellen. Die zusätzliche Apoptoseinduktion durch H₂O₂ löst bei den in Basalmedium kultivierten Zellen einen zusätzlichen Apoptosestimulus aus und resultierte in einer noch ausgeprägteren Reduktion der Zahl apoptotischer Zellen. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Abnahme der apoptotischen Zellen bei Zunahme der Zahl proliferierender Zellen. Dieser Ergebnisse belegen in der Tat, dass ein Ausschalten von PTEN einen sowohl proliferativen als auch anti-apoptotischen Effekt auf VSMC ausübt.

5.5 Überexpression von PTEN verhindert die serum-induzierte Akt-Phosphorylation

Wie wir in den vorausgegangenen Experimenten belegen konnten, ist PTEN aktiv an der Apoptoseinduktion von VSMC beteiligt. Zuvor wurde in vielen Arbeiten beschrieben, dass PTEN PIP₃ zu PIP₂ degradiert und somit eine Aktivierung von Akt hemmt ^[47, 48, 58]. Die anti-apoptotische Funktion von Akt konnte durch Versuche anderer Arbeitsgruppen dadurch bewiesen werden, dass Zellen, die kein PTEN exprimieren eine höhere Akt-Kinase-Aktivität aufweisen und widerstandsfähiger gegen Apoptose sind ^[132]. Eine Überexpression von Akt bewirkt in kardialen Myocyten eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Apoptose, wohingegen *Knockdown* von Akt2/PKB β zu einer verstärkten Apoptose als Antwort auf eine myokardiale Ischämie reagiert ^[133, 134].

Es wurde in zahlreichen Studien berichtet, dass Akt von einer Vielfalt stressinduzierender Faktoren stimuliert wird, was zu einer Blockade des apoptotischen Zelltodes führt ^[135]. Andere zelluläre Stressfaktoren wie Hitzeschock und Hyperosmolarität (beide sind in die

Aktivierung von p38/HOG1-Kinase-Kaskade involviert) sind ebenfalls in der Lage, die Aktivität von Akt zu triggern ^[136].

Akt übermittelt Überlebenssignale bzw. inhibiert Apoptose durch Phosphorylierung und Inaktivierung von einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2-Familie, dem *Bcl-2-Antagonist of Cell Death-Protein* (BAD und der im Apoptose-Signalweg gelegenen Cystein-Proteinase Caspase-9 ^[68]. Zusätzlich zur Förderung des Überlebens der Zelle wird davon ausgegangen, dass Akt durch Phosphorylierung anderer Zielmoleküle die Zellproliferation reguliert: Die Akt-katalysierte Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase, GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) führt zu dessen Inaktivierung. GSK3 fördert die Proteolyse von Cyclin D, d.h. durch Inhibierung von GSK3 trägt Akt möglicherweise zu Cyclin D-Akkumulation und Eintritt in den Zellzyklus bei ^[137, 68].

Kürzlich konnten wir zeigen, dass mechanischer Stress sehr schnell PI3-K/Akt in ruhenden, serumfreien VSMC aktiviert und somit zu einer Proliferation führt ^[20, 23]. Um weitere Einblicke in das Verhalten von PTEN zu erhalten, habe ich mich in weiteren Untersuchungen mit der Frage beschäftigt, über welche Mechanismen PTEN die Apoptose verstärkt. Zu diesem Zweck habe ich mir angeschaut, wie sich die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung nach Überexpression von PTEN verhält. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass eine Überexpression von PTEN eine Aktivierung von Akt verhindert, was dadurch zu einer verstärkten Apoptose von ruhenden sowie durch H₂O₂-stimulierten Zellen führt.

5.6 Co-Expression von PTEN und Akt kehrt den pro-apoptotischen Effekt einer PTEN-Überexpression um

In den vorausgegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass eine PTEN-Überexpression eine Akt-Aktivierung verhindert und somit apoptosefördernd wirkt. Demnach müsste eine zeitgleiche Überexpression von PTEN und einer konstitutiv aktiven Akt-Mutante die Effekte einer PTEN-Überexpression aufheben können.

Wie in dieser Untersuchung gezeigt werden kann, gleicht eine parallele Überexpression von PTEN und Akt tatsächlich den beobachteten pro-apoptotischen Effekt durch alleinige Überexpression von PTEN wieder aus. Die Apoptoserate konnte auf das ursprüngliche Niveau zurückgebracht werden. Damit wird deutlich, dass PTEN tatsächlich seinen pro-apoptotischen Effekt über eine Hemmung der Akt-Aktivierung vermittelt und somit die anti-apoptotische Wirkung von Akt hemmt.

In Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich zeigen, dass die PTEN-Expression und Aktivität nach Gefäßverletzung hochreguliert ist, die Apoptose von VSMC verstärkt, und somit eine wichtige Funktion für die frühe Phase des Remodelings nach Angioplastie zu haben scheint. Wie Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld zeigten, führt nämlich eine verstärkte Apoptose in der Frühphase nach Dilatation zu einer verstärkten Neointimabildung in der Folge.

Die Ergebnisse zeigen, dass PTEN einen erheblichen Einfluss auf die Funktion von glatten Gefäßmuskelzellen hat und in diesem Kontext für den Prozess der Neointima-Entwicklung nach Ballondilatation *in vivo* von Bedeutung sein könnte. Insbesondere wenn an eine Überexpression bzw. Aktivierung von PTEN gedacht werden muss, sollte der Zeitpunkt dabei jedoch wegen der pro-apoptotischen Wirkung bedacht gewählt werden und sollte nicht unmittelbar nach der Gefäßverletzung erfolgen, da hier das Ausmaß der Verletzung durch Apoptose verstärkt und über eine gesteigerte Proliferation in der Folge somit langfristig ein ungünstiger Effekt erzielt werden könnte. Eine Überexpression bzw. Aktivierung sollte daher eher zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, um durch den anti-proliferativen Effekt der Neointima-Entstehung entgegen zu wirken.

Die hier dargestellten Ergebnisse liefern somit einen entscheidenden Schritt zum besseren Verständnis von PTEN insbesondere im Hinblick auf eine eventuelle zukünftige Beeinflussung dieses Proteins zur Hemmung der Restenose.

6. Ausblick

Weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente sind notwendig, um die Rolle der Apoptose und Proliferation während vaskulärer Remodeling-Prozesse und vaskuloproliferativer Erkrankungen zu untersuchen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, nimmt die Lipidphosphatase PTEN über die Inhibition des PI3-Kinase/ Akt-Signalweges eine Schlüsselfunktion bei der Apoptose, Proliferation sowie Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und somit bei vaskuloproliferativen Erkrankungen ein. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, ist gerade das Zusammenspiel von apoptotischen und proliferativen Prozessen für das Entstehen vaskuloproliferativer Erkrankungen verantwortlich zu machen. In *in vivo*-Versuchen konnte eine vermehrte PTEN-Expression in apoptotischen Zellen nach Gefäßverletzung durch Angioplastie beobachtet werden, die eine apoptotische Wirkung von PTEN in der frühen Phase nach einer Gefäßverletzung erkennen lässt. Durch eine gezielte Hemmung der PTEN-Expression in den frühen Phasen nach Gefäßdilatation könnte möglicherweise die Apoptose der geschädigten Zellen minimiert und somit die sich im weiteren Verlauf entwickelnde Ausbildung einer Intimahyperplasie, ausgelöst durch eine überschießende Proliferation der Zellen, verhindert werden. Zu einem späteren Zeitpunkt dagegen könnten die anti-proliferativen Eigenschaften von PTEN in Hinblick auf die Entstehung der Neointima durchaus positive Effekte haben.

Die Rolle der PTEN-vermittelten Apoptose während der Gefäßverletzung und der dadurch vermittelten Remodeling-Prozesse stellt somit sicherlich einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar.

7. Zusammenfassung

Vaskuloproliferative Erkrankungen stellen auch heute noch eine der Haupttodesursachen weltweit dar. Die Proliferation und Migration sowie die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose und der nach Ballondilatationen auftretenden Restenose. Diese zunächst ätiologisch unterschiedlichen Prozesse haben eine Stimulation sonst ruhender glatter Gefäßmuskelzellen mit nachfolgender Proliferation, aber andererseits auch Apoptose gemeinsam. Hinlänglich bekannt ist der PI3-Kinase/Akt-Signalweg, der bei den unterschiedlichsten Zelltypen über eine Aktivierung membranspezifischer Rezeptoren zu einer Aktivierung der PI3-Kinase führt, die dann PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert und somit über eine Aktivierung verschiedener vorgeschalteter Kinasen (PDK-1) Akt aktiviert. Damit ist ein Fortschreiten des Zellzyklus mit Zellproliferation und -migration möglich. Die Phosphatase PTEN hat über ihre herausragende Eigenschaft als „duale Lipid- und Proteinphosphatase“ eine weitreichende Funktion für das Überleben und Wachstum von Zellen. Als Gegenspieler der PI3-Kinase dephosphoryliert PTEN PIP₃ zu PIP₂ und inhibiert somit die nachfolgende Akt-Aktivierung. Durch ihre Eigenschaft als Proteinphosphatase führt PTEN zu einer Herunterregulation des Zellzyklus-antreibenden Cyclin D1 und bewirkt einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus.

Zunächst wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Funktion von PTEN bei maligner Entartung von Zellen verschiedensten Ursprunges untersucht (Melanome, Glioblastome sowie Nieren-, Brust-, Prostata- und Lungenkrebs). Hierbei zeigte sich, dass in Abwesenheit von PTEN vermehrt Karzinome als Zeichen einer gesteigerten Proliferation entstehen. Hinsichtlich des komplexen Geschehens bei atherosklerotischen Vorgängen konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass PTEN über seine antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen hemmen kann. In vorangegangenen Arbeiten wurde insbesondere der Proliferation und Migration von VSMC eine besondere Beachtung geschenkt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PTEN auf die Funktion glatter Gefäßmuskelzellen unter besonderer Beachtung der Apoptose und Proliferation *in vivo* und *in vitro* untersucht, da diesen Vorgängen eine Schlüsselrolle in der Entstehung und bei Komplikationen vaskuloproliferativer Erkrankungen zukommt.

Zu diesem Zweck wurde PTEN zum einen überexprimiert, zum anderen gezielt ausgeschaltet, um den Einfluss auf die Zahl der apoptotischen und proliferierenden Zellen zu untersuchen.

Die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen *in vivo* wurde an Hand von Gefrierschnitten aus der A. carotis communis von Ratten, die einer Ballondilatation unterzogen wurden, beobachtet. Gerade die frühe Phase der Apoptose, die Minuten bis Tage nach der Ballondilatation auftritt, ist für das Ausmaß der späteren Neointima-Ausbildung verantwortlich. Das initiale Trauma entscheidet hierbei maßgeblich über den Heilungsprozess und die Wiederverschlussrate der dilatierten Gefäße.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass PTEN möglicherweise nicht nur in geschädigten Zellen vermehrt exprimiert wird, sondern dass PTEN möglicherweise sogar erst die geschädigten Zellen in die Apoptose "treibt". Dies hätte weitreichende Folgen für die Prävention der Restenose nach Ballondilatation. Eine gezielte Hemmung der PTEN-Expression in den frühen Phasen nach Gefäßdilatation könnte möglicherweise die Apoptose der geschädigten Zellen minimieren und - unter Berücksichtigung der anti-proliferativen Eigenschaften von PTEN zu einem späteren Zeitpunkt - die sich im weiteren Verlauf entwickelnde Ausbildung einer Intimahyperplasie verhindern.

Die Ergebnisse *in vitro* zeigen nun, dass es unter einer vermehrten Expression von PTEN zu einer Zunahme apoptotischer Zellen und zu einer Verringerung der Zahl proliferierender Zellen kommt. Die Expression von PTEN ist bei ruhenden sowie bei wachstumsstimulierten Zellen konstant, wird aber durch apoptose-auslösende Stimuli wie H₂O₂ hochreguliert. Darüber hinaus zeigt sich, dass die PTEN-Aktivität in dilatierten Gefäßen deutlich stärker ist als in nicht-dilatierten Arterien. Unsere Daten tragen dazu bei, die PTEN-abhängigen Mechanismen im Bezug auf die vaskuläre Homöostase und die Pathophysiologie vaskuloproliferativer Erkrankungen besser zu verstehen und hieraus eventuelleneue Therapiekonzepte zu entwickeln.

8. Abstract

Role of the phosphatase PTEN during vascular remodeling

Widmer-Teske R¹, Mueller A¹, Stieger P¹, Tillmanns H¹, Braun-Dullaeus RC², Sedding DG¹

¹Department of Internal Medicine I, Cardiology/Angiology, Giessen University, Giessen, Germany, ²Division of Cardiology, University Hospital Magdeburg, Magdeburg, Germany

Background: The phosphatase PTEN represents an important physiological inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/protein kinase B (Akt) signalling, however, the functional role of PTEN during vascular remodeling remains elusive. In the present study we sought to determine PTEN's effect on vascular smooth muscle cell (VSMC) function and neointima formation in vivo.

Methods and Results: Immunohistochemistry indicated a faint expression and equal distribution of PTEN in uninjured rat carotid arteries. 12h following balloon-injury, PTEN expression was strongly increased in apoptotic (TUNEL+) VSMC. In vitro, stimulation with serum or different growth factors or subjecting VSMC to cyclic stretch had no effect on PTEN expression, whereas stimulation with H₂O₂ robustly increased PTEN expression in a time- and dose-dependent manner. To evaluate the functional role of PTEN expression, human VSMC were transduced with WT-PTEN. Overexpression of PTEN increased the number of apoptotic VSMC (14.8 ± 2.3 vs. $3.6 \pm 0.8\%$, $P < 0.05$) as determined by TUNEL assay. In contrast, siRNA-mediated knock-down of PTEN attenuated the basal as well as H₂O₂-induced apoptosis of VSMC. Mechanistically, overexpression of PTEN prevented serum-induced Akt-phosphorylation, whereas siRNA-mediated knock down of PTEN augmented Akt-activation. Moreover, co-transfection of PTEN and a constitutive active Akt mutant prevented VSMC from PTEN-induced apoptosis, indicating, that PTEN augments VSMC apoptosis by inhibition of Akt phosphorylation/activation.

Conclusion: By interfering with the PI3-K/Akt-dependent survival signalling, the oxidative stress-induced upregulation of PTEN in VSMC of injured arteries augments the sensitivity of VSMC to apoptotic stimuli in the early phase following vascular injury. Thus, these data add substantially to our understanding of PTEN's role during vascular remodelling.

Literaturverzeichnis

1. **Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, et al.** Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. May 8 1999;353(9164):1547-1557.
2. **Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, et al.** Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. Sep 1988;12(3):616-623.
3. **Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, et al.** Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. Feb 1988;77(2):361-371.
4. **Kuntz RE, Baim DS.** Prevention of coronary restenosis: the evolving evidence base for radiation therapy. *Circulation*. May 9 2000;101(18):2130-2133.
5. **Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al.** A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. Jun 6 2002;346(23):1773-1780.
6. **Fajadet J, Morice MC, Bode C, et al.** Maintenance of long-term clinical benefit with sirolimus-eluting coronary stents: three-year results of the RAVEL trial. *Circulation*. Mar 1 2005;111(8):1040-1044.
7. **Mangi AA, Dzau VJ.** Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med*. Apr 2001;33(3):153-155.
8. **Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, et al.** Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. Dec 19 2006;48(12):2584-2591.
9. **Lagerqvist B, James SK, Stenestrand U, et al.** Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *N Engl J Med*. Mar 8 2007;356(10):1009-1019.
10. **Ross R.** Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
11. **Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. Mar 5 2002;105(9):1135-1143.
12. **Ross R.** Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. Nov 1999;138(5 Pt 2):S419-420.
13. **Ross R, Glomset JA.** Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. Jun 29 1973;180(93):1332-1339.
14. **Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME.** The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. Sep 2000;2(5):422-429.
15. **Velican C, Velican D.** Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med Interne*. Jan-Mar 1976;14(1):17-24.
16. **Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, et al.** Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*. Jun 15 1996;93(12):2178-2187.
17. **Faxon DP, Sanborn TA, Weber VJ, et al.** Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. May-Jun 1984;4(3):189-195.

18. **Faxon DP, Weber VJ, Haudenschild C, et al.** Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. Mar-Apr 1982;2(2):125-133.
19. **Welt FG, Rogers C.** Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 1 2002;22(11):1769-1776.
20. **Sedding DG, Seay U, Fink L, et al.** Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. Aug 5 2003;108(5):616-622.
21. **Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al.** Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. May 28 1987;316(22):1371-1375.
22. **Gibbons GH, Dzau VJ.** The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. May 19 1994;330(20):1431-1438.
23. **Sedding DG, Homann M, Seay U, et al.** Calpain counteracts mechanosensitive apoptosis of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Faseb J*. Feb 2008;22(2):579-589.
24. **Durand E, Mallat Z, Addad F, et al.** Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol*. May 15 2002;39(10):1680-1685.
25. **Hanke H, Strohschneider T, Oberhoff M, et al.** Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res*. Sep 1990;67(3):651-659.
26. **Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, et al.** Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *Cardio-vasc Res*. Feb 2000;45(3):766-776.
27. **Kollum M, Kaiser S, Kinscherf R, et al.** Apoptosis after stent implantation compared with balloon angioplasty in rabbits. Role of macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nov 1997;17(11):2383-2388.
28. **Malik N, Francis SE, Holt CM, et al.** Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation*. Oct 20 1998;98(16):1657-1665.
29. **Perlman H, Maillard L, Krasinski K, et al.** Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*. Feb 18 1997;95(4):981-987.
30. **Walsh K, Smith RC, Kim HS.** Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res*. Aug 4 2000;87(3):184-188.
31. **Dzau VJ, Braun-Dullaes RC, Sedding DG.** Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. Nov 2002;8(11):1249-1256.
32. **Ruef J, Meshel AS, Hu Z, et al.** Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat. *Circulation*. Aug 10 1999;100(6):659-665.
33. **Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, et al.** First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation*. Apr 23 2002;105(16):1883-1886.
34. **Brooks EE, Gray NS, Joly A, et al.** CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem*. Nov 14 1997;272(46):29207-29211.
35. **Teirstein PS, Massullo V, Jani S, et al.** Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. Jun 12 1997;336(24):1697-1703.

36. **Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al.** A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* Dec 3 1998;339(23):1665-1671.
37. **Costa MA, Sabate M, van der Giessen WJ, et al.** Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation.* Aug 24 1999;100(8):789-792.
38. **von Hodenberg E, Tost B, Scheffold T.** [New strategies in the treatment of restenosis]. *Z Kardiol.* 2000;89 Suppl 7:19-22.
39. **Albiero R, Adamian M, Kobayashi N, et al.** Short- and intermediate-term results of (32)P radioactive beta-emitting stent implantation in patients with coronary artery disease: The Milan Dose-Response Study. *Circulation.* Jan 4-11 2000;101(1):18-26.
40. **Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, et al.** Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* Oct 30 1999;354(9189):1493-1498.
41. **Sedding DG.** FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing - a new fork on the way to longevity? *Biol Chem.* Mar 2008;389(3):279-283.
42. **Fukuda R, Hayashi A, Utsunomiya A, et al.** Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 18 2005;102(42):15213-15218.
43. **Goberdhan DC, Wilson C.** PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum Mol Genet.* Oct 15 2003;12 Spec No 2:R239-248.
44. **Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, et al.** Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* Mar 1 2000;14(5):505-520.
45. **Waite KA, Eng C.** Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet.* Apr 2002;70(4):829-844.
46. **Workman P, Clarke PA, Guillard S, et al.** Drugging the PI3 kinome. *Nat Biotechnol.* Jul 2006;24(7):794-796.
47. **Maehama T, Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* May 29 1998;273(22):13375-13378.
48. **Wu X, Senechal K, Neshat MS, et al.** The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 22 1998;95(26):15587-15591.
49. **Huang J, Kontos CD.** Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and survival by the tumor suppressor protein PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* May 1 2002;22(5):745-751.
50. **Huang J, Niu XL, Phippen AM, et al.** Adenovirus-mediated intraarterial delivery of PTEN inhibits neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2005;25(2):354-358.
51. **Wang X, Xiao Y, Mou Y, et al.** A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res.* Feb 22 2002;90(3):340-347.
52. **Harada H, Andersen JS, Mann M, et al.** p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 14 2001;98(17):9666-9670.
53. **Sulis ML, Parsons R.** PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* Sep 2003;13(9):478-483.
54. **Dimmeler S, Zeiher AM.** PTEN-uating restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* May 1 2002;22(5):715-716.
55. **Fox R. Bristol scandal.** *Circulation.* Aug 14 2001;104(7):E9014-9014.
56. **Schmelzle T, Hall MN.** TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* Oct 13 2000;103(2):253-262.

57. **Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, et al.** Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 23 1998; 95(13):7772-7777.
 58. **Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, et al.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* Oct 2 1998;95(1):29-39.
 59. **Li J, Yen C, Liaw D, et al.** PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* Mar 28 1997; 275(5308):1943-1947.
 60. **Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al.** Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* Apr 1997;15(4):356-362.
 61. **Li DM, Sun H.** TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* Jun 1 1997;57(11):2124-2129.
 62. **Ittmann M.** Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res.* May 1 1996;56(9):2143-2147.
 63. **Hong TM, Yang PC, Peck K, et al.** Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Sep 2000;23(3):355-363.
 64. **Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al.** P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19 1997;94(17):9052-9057.
 65. **Tsou HC, Teng DH, Ping XL, et al.** The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. *Am J Hum Genet.* Nov 1997;61(5):1036-1043.
 66. **Di Cristofano A, Pandolfi PP.** The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell.* Feb 18 2000;100(4):387-390.
 67. **Hamilton JA, Stewart LM, Ajayi L, et al.** The expression profile for the tumour suppressor gene PTEN and associated polymorphic markers. *Br J Cancer.* May 2000; 82(10):1671-1676.
 68. **Cantley LC, Neel BG.** New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 13 1999;96(8):4240-4245.
 69. **Das S, Dixon JE, Cho W.** Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 24 2003;100(13):7491-7496.
 70. **Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, et al.** Form and function in protein dephosphorylation. *Cell.* Nov 1 1996;87(3):361-364.
 71. **Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al.** Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* Oct 29 1999;99(3):323-334.
 72. **Yamada KM, Araki M.** Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* Jul 2001;114(Pt 13):2375-2382.
 73. **Craven SE, Brecht DS.** PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell.* May 15 1998;93(4):495-498.
 74. **Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, et al.** Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 11 2000;97(8):4233-4238.
-

75. **Wu Y, Dowbenko D, Spencer S, et al.** Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem.* Jul 14 2000;275(28):21477-21485.
76. **Stambolic V, MacPherson D, Sas D, et al.** Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* Aug 2001;8(2):317-325.
77. **Janik DM.** Das intrakraniale Meningeom des Hundes. 2005.
78. **Tamura M, Gu J, Tran H, et al.** PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* Nov 3 1999;91(21):1820-1828.
79. **Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, et al.** Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 2 1999;96(5):2110-2115.
80. **Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, et al.** Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* Aug 1996;134(3):793-799.
81. **Owens LV, Xu L, Craven RJ, et al.** Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* Jul 1 1995;55(13):2752-2755.
82. **Tamura M, Gu J, Danen EH, et al.** PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.* Jul 16 1999;274(29):20693-20703.
83. **Huang J, Kontos CD.** PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem.* Mar 29 2002;277(13):10760-10766.
84. **Dimmeler S, Zeiher AM.** Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circ Res.* Jan 7-21 2000;86(1):4-5.
85. **Datta SR, Brunet A, Greenberg ME.** Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* Nov 15 1999;13(22):2905-2927.
86. **Costa MA, Simon DI.** Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation.* May 3 2005;111(17):2257-2273.
87. **Irani K.** Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* Aug 4 2000;87(3):179-183.
88. **Kops GJ, Burgering BM.** Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *J Mol Med.* Sep 1999;77(9):656-665.
89. **Kandel ES, Hay N.** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* Nov 25 1999;253(1):210-229.
90. **Duan C, Bauchat JR, Hsieh T.** Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res.* Jan 7-21 2000;86(1):15-23.
91. **Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, et al.** Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest.* Oct 2000;106(8):1011-1020.
92. **Woods TC, Marks AR.** Drug-eluting stents. *Annu Rev Med.* 2004;55:169-178.
93. **Chang CJ, Mulholland DJ, Valamehr B, et al.** PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol.* May 2008;28(10):3281-3289.
94. **Ginn-Pease ME, Eng C.** Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* Jan 15 2003;63(2):282-286.
95. **Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, et al.** A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci.* Feb 15 2000;20(4):1404-1413.

-
96. **Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al.** Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun 2000; 85(6):2334-2338.
 97. **Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, et al.** Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* May 1 2002;99(1):63-67.
 98. **Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al.** Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* Jan 12 2007;128(1):157-170.
 99. **Griendling KK, Harrison DG.** Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res.* Sep 17 1999;85(6):562-563.
 100. **Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* Dec 2003;42(6):1075-1081.
 101. **Lee SR, Yang KS, Kwon J, et al.** Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem.* Jun 7 2002;277(23):20336-20342.
 102. **Li PF, Dietz R, von Harsdorf R.** Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett.* Mar 10 1997;404(2-3):249-252.
 103. **Li Z, Jiang H, Xie W, et al.** Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.* Feb 11 2000;287(5455):1046-1049.
 104. **Cesaratto L, Calligaris SD, Vascotto C, et al.** Bilirubin-induced cell toxicity involves PTEN activation through an APE1/Ref-1-dependent pathway. *J Mol Med.* Oct 2007;85(10):1099-1112.
 105. **Castellino AM, Chao MV.** Differential association of phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase with the EGF/ErbB family of receptors. *Cell Signal.* Mar 1999; 11(3):171-177.
 106. **Pines A, Bivi N, Romanello M, et al.** Cross-regulation between Egr-1 and APE/Ref-1 during early response to oxidative stress in the human osteoblastic HOBIT cell line: evidence for an autoregulatory loop. *Free Radic Res.* Mar 2005;39(3):269-281.
 107. **Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, et al.** Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol.* Aug 1995;147(2):267-277.
 108. **Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, et al.** Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol.* May 1995; 146(5):1059-1064.
 109. **Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, et al.** Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol.* Oct 2000; 157(4):1259-1268.
 110. **Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, et al.** Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* May 1993;69(5):377-381.
 111. **Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, et al.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* Sep 2006; 12(9):1075-1080.
 112. **Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al.** Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med.* May 1 1997; 336(18):1276-1282.
 113. **Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, et al.** Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res.* Feb 1999;41(2):480-488.
-

-
114. **Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT.** Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta*. Oct 7 1993;1179(1):27-75.
 115. **Insall RH, Weiner OD.** PIP3, PIP2, and cell movement-similar messages, different meanings? *Dev Cell*. Dec 2001;1(6):743-747.
 116. **Toker A, Newton AC.** Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem*. Mar 24 2000;275(12):8271-8274.
 117. **Persad S, Attwell S, Gray V, et al.** Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 28 2000; 97(7):3207-3212.
 118. **Bennett MR.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*. Feb 1999;41(2):361-368.
 119. **Li J, Simpson L, Takahashi M, et al.** The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res*. Dec 15 1998;58(24):5667-5672.
 120. **Sedding D G VS, Ramaswamy S, Heidt M, Tillmanns H, Preissner KT, Sellers WR, Braun-Dullaeus RC.** Forkhead Transkription Faktor FoxO1a: A central player of Neointima Formation Through Modulation of Proliferation, Migration and Apoptosis. *In Revision*. 2006.
 121. **Brunet A, Datta SR, Greenberg ME.** Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*. Jun 2001;11(3):297-305.
 122. **Meier R, Alessi DR, Cron P, et al.** Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem*. Nov 28 1997; 272 (48):30491-30497.
 123. **Bijur GN, Jope RS.** Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem*. Dec 2003;87(6):1427-1435.
 124. **Li DM, Sun H.** PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 22 1998;95(26):15406-15411.
 125. **Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK.** The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res*. Nov 15 1998;58(22):5002-5008.
 126. **Koide S, Okazaki M, Tamura M, et al.** PTEN reduces cuff-induced neointima formation and proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun 2007;292(6):H2824-2831.
 127. **Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al.** Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. Jun 5 1998;280(5369):1614-1617.
 128. **Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, et al.** Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2001;21(7):1152-1158.
 129. **Schuppel M, Kurschner U, Kleuser U, et al.** Sphingosine 1-Phosphate Restrains Insulin-Mediated Keratinocyte Proliferation via Inhibition of Akt through the S1P(2) Receptor Subtype. *J Invest Dermatol*. Jan 24 2008.
 130. **Jacob A, Lee TX, Neff BA, et al.** Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation in human vestibular schwannoma. *Otol Neurotol*. Jan 2008;29(1):58-68.
-

131. **Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE.** Regulation of Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Growth During Development by FOXO Transcription Factors. *Circ Res.* Jan 24 2008.
132. **Cantley LC.** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* May 31 2002; 296(5573):1655-1657.
133. **Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, et al.** The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 2004; 37(2):449-471.
134. **DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, et al.** Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem.* Oct 27 2006;281(43):32841-32851.
135. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, et al.** Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* Aug 6 1999;274(32):22699-22704.
136. **Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, et al.** Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 23 1996;93(15):7639-7643.
137. **Doble BW, Woodgett JR.** GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* Apr 1 2003;116(Pt 7):1175-1186.

Publikationen

Abstracts:

"Role of the Phosphatase PTEN During Vascular Remodeling"
Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK)
75. Jahrestagung Mannheim, Germany, 16.04.-18.04.2009

"Role of the Phosphatase PTEN During Vascular Remodeling"
Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS)
Annual Retreat Bad Nauheim, Germany, 03.07.-04.07.2009

"Role of the Phosphatase PTEN During Vascular Remodeling"
European Society of Cardiology (ESC)
Congress Barcelona, Spanien, 29.08.-02.09.2009

"Role of the Phosphatase PTEN During Vascular Remodeling"
European Meeting of Vascular Biology and Medicine (EMVBM)
5th Meeting of EMVBM Marseille, France, 14.09.-17.09.2009

"Role of the Phosphatase PTEN During Vascular Remodeling"
America Heart Association (AHA)
Scientific Sessions Orlando, Florida, USA, 15.11.-17.11.2009

"The pro-apoptotic effect of PTEN is mediated by the inhibition of the PI3K-Akt pathway
after vascular injury"
European Society of Cardiology (ESC)

FCVB "Frontiers in CardioVascular Biology" Berlin, Germany, 16.07.-19.07.2010

"The pro-apoptotic effect of PTEN is mediated by the inhibition of the PI3K-Akt pathway
after vascular injury"
Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK)
76. Jahrestagung Mannheim, Germany, 08.04.-10.04.2010

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
APE1/Ref-1	Apurinic apyrimidinic endonuclease redox effector factor-1
As	Aminosäure
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death- Protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BpV	Dipotassium bisperoxo(5-ydroxypyridine-2-carboxyl)oxovanadate
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cyclin dependent kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase Inhibitor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale Nitrit-Oxid-Synthase
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötales Kälberserum
GSK 3 β	Glycogen-Synthase-Kinase 3 β
h	Stunde
HcaSMC	Human coronary arteria smooth musle cell
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-3	Interleukin-3
IL-1 B	Interleukin-1beta
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MACE	Major adverse cardiac events
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromol
n	Anzahl
NGF	nerve growth factor
nm	Nanomol
P	Wahrscheinlichkeit

PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat
PDGF	platelete derived growth factor
PFFK2	6-phopsho-fructo-2-Kinase
PTCA	perkutane transluminale Koronarangiographie
ROS	reactive oxygen species,Sauerstoffradikale
SMC	smooth muscle cells
siRNAs	Small interfering RNAs
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM- 1	Vascular cell adhesions molecule
VEGF	vascularendothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells

Erklärung gemäß Promotionsordnung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Professor Tillmanns für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

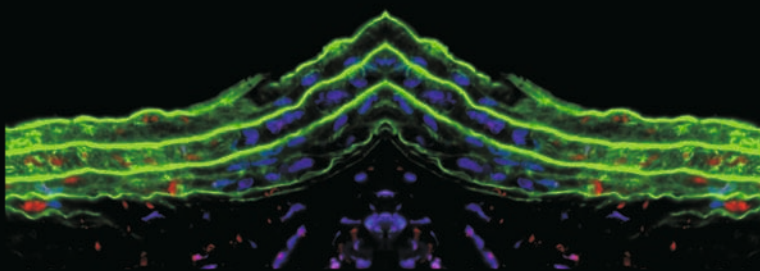
Mein ganz besonderer Dank gilt Professor Sedding sowie Professor Brau- Dullaeus für die Überlassung dieses interessanten Themas und die vielen fruchtbaren Diskussionen, die meine Neugierde an molekular-biologischen Zusammenhängen bestärkt und deren Anregungen entscheidend . zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie, die mir immer wieder mit Tipps, Tricks und praktischer Hilfe die Arbeit im Labor erleichtert haben, insbesondere Frau Dr. Rebecca Widmer-Tesske und Frau Stefanie Wolfram. Herrn Philipp Stieger danke ich für die kritische Durchsicht der Texte und die kollegiale sowie freundschaftliche Zusammenarbeit auch außerhalb des Labors.

Frau Dr. Rebecca Widmer-Tesske danke ich besonders für Ihre engagierte Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der Experimente, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Meiner Ehefrau Julia Müller danke ich ganz herzlich für die kontinuierliche Motivation und Anregungen sowie wissenschaftliche Diskussion.

Besonders möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und Geduld, Verständnis und Vertrauen danken, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5616-2



9 783835 195616 2